



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**DESARROLLO DEL PROCESO DE
PRODUCCIÓN DE UNA VACUNA
PARA EL TRATAMIENTO DE LA
ALERGIA A GRAMÍNEAS BASADA EN
UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE**

Maidier Villate Fernández

Tesis doctoral

Leioa, 2020

DESARROLLO DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE UNA VACUNA PARA EL TRATAMIENTO DE LA ALERGIA A GRAMÍNEAS BASADA EN UNA PROTEÍNA RECOMBINANTE

ROXALL Medicina España (Parque Tecnológico Zamudio)

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencia y Tecnología
Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

Memoria presentada por
Maidier Villate Fernández
para optar al grado de Doctor
por la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea

Trabajo dirigido por:
Juan A. Asturias Ortega
Jesús M. Arizmendi Bastarrika

Portada: Photo by Marvin Ronsdorf on Unsplash

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, dentro del marco de “Ayudas para la formación de Doctores en empresas “Doctorados Industriales” (Referencia: DI-15-07874)”.

Agradecimientos

Quiero dedicar estas líneas a mostrar mi agradecimiento a todos los que han colaborado en el desarrollo de esta tesis, tanto a nivel profesional como personal.

En primer lugar, a mis directores de tesis por darme la oportunidad de realizar esta tesis y seguir desarrollando mi carrera profesional, combinando el conocimiento científico teórico con su aplicación en la industria farmacéutica.

A Mikel, Igor e Itzi, increíbles compañeros que me han ayudado, acompañado, guiado, animado, aguantado, tanto dentro como fuera del laboratorio. Ha sido un auténtico placer trabajar codo con codo con vosotros.

A Sara e Izaskun, por su ayuda en los momentos de agobio y por esas tertulias tan interesantes durante los cafés. Un soplo de aire fresco en momentos grises.

A todo el laboratorio de LP/LA, por su ayuda y apoyo. Este último año hemos compartido experiencias que me han cambiado para siempre. Estando unidos, si se quiere, se puede.

Mil gracias a mi familia: a Borja, por acompañarme en este viaje y aguantarme en los momentos más difíciles, dándome ánimos para continuar. A mis txikis, por el tiempo que han tenido que compartir a su amatxu con la tesis. ¡Gracias!

ÍNDICE



INDICE

| | |
|--|-----------|
| ABREVIATURAS | V |
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 1.1. LA ALERGIA | 3 |
| 1.1.1. El sistema inmunitario | 3 |
| 1.1.2. Trastornos del sistema inmunitario | 3 |
| 1.1.3. La alergia como trastorno del sistema inmunitario | 4 |
| 1.1.4. Importancia económica de la alergia | 6 |
| 1.1.5. Alergia a gramíneas | 7 |
| 1.2. PHLEUM PRATENSE | 7 |
| 1.2.1. Introducción | 7 |
| 1.2.2. Alérgenos de <i>Phleum pratense</i> | 9 |
| 1.3. INMUNOTERAPIA | 13 |
| 1.3.1. Introducción | 13 |
| 1.3.2. Mecanismo de la inmunoterapia | 14 |
| 1.3.3. Limitaciones e inconvenientes de la inmunoterapia | 15 |
| 1.4. VACUNAS RECOMBINANTES HIPOALERGÉNICAS | 16 |
| 1.4.1. Ventajas | 16 |
| 1.4.2. Fabricación GMP de una vacuna recombinante | 16 |
| 1.4.3. Vacuna recombinante hipoalérgica para el tratamiento de la alergia a gramíneas | 18 |
| OBJETIVOS | 19 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 23 |
| 2.1. TÉCNICAS RELACIONADAS CON LA SÍNTESIS DE PROTEÍNA. ETAPA USP (UPSTREAM PROCESS) | 23 |
| 2.1.1. Banco celular | 23 |
| 2.1.2. Producción de biomasa | 24 |
| 2.1.3. Lisis y clarificación (escala biorreactor) | 26 |
| 2.2. TÉCNICAS RELACIONADAS CON LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA - ETAPA DSP (DOWNSTREAM PROCESS) | 26 |
| 2.2.1. Cromatografía de intercambio iónico (IEX) | 27 |
| 2.2.2. Cromatografía de interacción hidrofóbica | 28 |
| 2.2.3. Empaquetado de columnas (Escalado) | 28 |
| 2.2.4. Cromatografía de exclusión molecular | 29 |
| 2.2.5. Placas Predictor | 29 |

| | |
|---|------------|
| 2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS | 30 |
| 2.3.1. SDS-PAGE y tinción de coomassie | 30 |
| 2.3.2. Western blot | 31 |
| 2.3.3. Cromatografía analítica | 31 |
| 2.3.4. Cuantificación de proteína total por Bradford | 32 |
| 2.3.5. Cuantificación de QG31 por el método de ELISA doble fase | 33 |
| 2.3.6. Cuantificación de endotoxinas (LAL) | 33 |
| 2.3.7. Cuantificación de HCPs mediante ELISA | 34 |
| 2.3.8. Dicroísmo circular | 35 |
| 2.3.9. Inmunogenicidad | 35 |
| 2.3.10. Actividad alergénica | 36 |
| 2.3.11. Reactividad IgE | 36 |
| 2.4. CUALIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS (DEFINICIÓN DE TÉRMINOS) | 37 |
| 3. RESULTADOS | 41 |
| 3.1. PRIMERA FASE DE DESARROLLO | 42 |
| 3.1.1. Crecimiento y sobreexpresión en biorreactor | 42 |
| 3.1.2. Purificación de QG31 | 43 |
| 3.1.3. Análisis de QG31 (Primera fase de desarrollo) | 44 |
| 3.1.4. Resumen de la Primera fase de desarrollo | 48 |
| 3.2. DESARROLLO Y CUALIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS | 50 |
| 3.2.1. SDS-PAGE | 51 |
| 3.2.2. Western blot | 56 |
| 3.2.3. Cuantificación de proteína total por Bradford | 59 |
| 3.2.4. Cuantificación de QG31 mediante ELISA | 63 |
| 3.2.5. Cromatografía analítica de tamizado molecular (SEC) | 67 |
| 3.2.6. Cromatografía analítica de Fase reversa (RP) | 70 |
| 3.2.7. Cuantificación de endotoxinas (LAL) | 74 |
| 3.2.8. Cuantificación de HCPs | 77 |
| 3.3. DESARROLLO DE LA ETAPA USP | 81 |
| 3.3.1. Crecimiento y expresión con la cepa <i>E. coli</i> LBP FTO PJ411_QG31 | 82 |
| 3.3.2. Diseño de experimentos (DoE) para la etapa USP | 83 |
| 3.3.3. Conclusión | 91 |
| 3.4. DESARROLLO DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN DE QG31 (DSP) | 91 |
| 3.4.1. Primera etapa cromatográfica: AEX | 92 |
| 3.4.2. Desarrollo de la segunda etapa cromatográfica: HIC | 107 |
| 3.4.3. Tercera etapa cromatográfica: DSC | 120 |
| 3.5. ANÁLISIS DEL PRODUCTO FINAL QG31 | 120 |
| 3.7. ESTUDIOS DE FORMULACIÓN | 124 |
| 4. RESUMEN | 128 |

| | |
|------------------------|------------|
| 5. CONCLUSIONES | 132 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 136 |

ABREVIATURAS

| | |
|--------------|--|
| AEX | <i>Anion Exchange chromatography</i> (cromatografía de intercambio aniónico) |
| APC | <i>Antigen presenting cell</i> (célula presentadora de antígeno) |
| As | Factor de asimetría |
| BSA | Seroalbúmina bovina |
| CCF | <i>Central composite face-centered design</i> (modelo compuesto centrado en la cara) |
| CD | Dicroísmo circular |
| CD40 | Antígeno de diferenciación leucocitaria nº 40 |
| cDNA | DNA complementario |
| CEX | <i>Cation Exchange chromatography</i> (cromatografía de intercambio catiónico) |
| Conc. | Concentración |
| CPP | <i>Critical Process Parameters</i> (parámetros críticos del proceso) |
| CQA | <i>Critical Quality Attributes</i> (atributos críticos de calidad) |
| CV | <i>Column volume</i> (volumen de columna) |
| DoE | <i>Design of Experiments</i> (Diseño de experimentos) |
| DSC | <i>Desalting chromatography</i> (cromatografía de desalado) |
| DSP | <i>Downstream Process</i> |
| EAN | <i>European Aeroallergen Network</i> (Red Europea de Aeroalérgenos) |
| EFA | Federación Europea de Alergia y Enfermedades de las Vías Respiratorias |
| EU | Unidades de Endotoxinas |
| kDa | Kilodalton |
| FcεRI | Receptor de alta afinidad para IgE |
| GMP | <i>Good Manufacturing Practice</i> (Buenas normas de fabricación) |

| | |
|--------------------------------|---|
| HCPs | <i>Host Cell Proteins</i> , proteínas de la célula hospedadora |
| HMW | High Molecular Weight markers |
| IFN-γ | Interferón gamma |
| IgE | Inmunoglobulina E |
| IgG4 | Inmunoglobulina G4 |
| IgG | Inmunoglobulina G |
| IgM | Inmunoglobulina M |
| IL | Interleucina |
| ITA | Inmunoterapia específica con alérgeno |
| ITE | Inmunoterapia específica |
| LC | Límite de cuantificación |
| LD | Límite de detección |
| LMW | <i>Low molecular weight markers</i> , marcadores de bajo peso molecular |
| μ | Velocidad de crecimiento (h^{-1}) |
| μm | micrómetro |
| mAU | miliunidades de absorbancia |
| Mr | Masa relativa |
| MCB | <i>Master cell bank</i> (banco celular maestro) |
| PBS | <i>Phosphate-buffered saline</i> (tampón fosfato) |
| PBS-T-B | PBS, Tween 0.05%, BSA 1% |
| pI | Punto isoeléctrico |
| PVDF | Fluoruro de polivinilideno |
| QbT | <i>Quality by Test</i> (calidad por ensayo) |
| QbD | <i>Quality by Design</i> (calidad desde el diseño) |
| QTPP | <i>Quality Target Product Profile</i> (objetivo de perfil de calidad de producto) |
| RCB | <i>Research cell bank</i> (banco celular de referencia) |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |

| | |
|-------------------------------|--|
| RP | <i>Reverse phase chromatography</i> (cromatografía de fase reversa) |
| SCIT | <i>Subcutaneous immunotherapy</i> (inmunoterapia subcutánea) |
| SDS-PAGE | <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) |
| SEC | <i>Size exclusion chromatography</i> (cromatografía analítica de exclusión molecular) |
| SLIT | <i>Sublingual immunotherapy</i> (inmunoterapia sublingual) |
| TFA | Trifluoroacético |
| TGF-β | Factor de crecimiento transformante beta |
| Th0 | Linfocito T cooperador o <i>helper</i> virgen |
| Th1 | Linfocito T cooperador o <i>helper</i> tipo 1 |
| Th2 | Linfocito T cooperador o <i>helper</i> tipo 2 |
| TPP | <i>Target Product Profile</i> (objetivo de perfil de producto) |
| t_R | tiempo de retención |
| Treg | Linfocito T regulador |
| UA | Unidades arbitrarias |
| UFC | Unidades formadoras de colonias |
| USP | <i>Upstream Process</i> |
| V_R | volumen de retención |
| vvm | volumen de aire por volumen de medio por minuto |
| μ | Velocidad de crecimiento |

1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA ALERGIA

1.1.1. El sistema inmunitario

El sistema inmunitario surgió durante la evolución para proteger a los organismos multicelulares de los agentes patógenos. Es muy adaptable, y defiende al organismo contra invasores muy diversos. La protección que confiere el sistema inmunitario se fundamenta en dos actividades: reconocimiento y reacción (o respuesta). El reconocimiento de un agente patógeno activa una reacción efectora que suprime o neutraliza al invasor. Determinadas exposiciones inducen una reacción de memoria que se caracteriza por una respuesta inmunitaria más rápida e intensa en caso de un posterior ataque por ese mismo agente¹. Se hace referencia a dos tipos de sistema inmunitario: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa².

La inmunidad innata siempre está disponible para combatir una amplia gama de agentes patógenos. Incluye mecanismos moleculares y celulares que suceden antes de una infección y cuyo fin es prevenirla o eliminarla. Las primeras células en responder tras la infección son los macrófagos, que tienen la capacidad de ingerir y matar microbios al producir diversas sustancias químicas tóxicas y enzimas degradantes potentes. Esta primera línea de defensa impide la mayor parte de las infecciones o las anula en las primeras horas tras el contacto. Es capaz de distinguir entre los elementos propios y extraños, pero no es específica, por lo que no tiene la capacidad de distinguir diferencias pequeñas en las moléculas extrañas.

La inmunidad adaptativa se establece en respuesta a las infecciones, es decir, se superpone con la respuesta inmunitaria innata y se adapta para reconocer, eliminar y más tarde recordar al patógeno invasor. Es capaz de eliminar infecciones con mayor eficiencia que la respuesta innata, provocando una respuesta inmunitaria más rápida e intensa. Constituye una segunda línea de defensa que elimina los patógenos que consiguen evadir las reacciones innatas o persisten a pesar de éstas. Una importante característica de la reacción inmunitaria adaptativa es la memoria. Si el mismo agente patógeno u otro estrechamente relacionado infecta al organismo en una segunda ocasión, las células de memoria aportan los medios para que el sistema inmunitario adaptativo monte un ataque rápido y normalmente muy eficaz contra el invasor.

Un aspecto importante de la respuesta inmunitaria es su propia regulación para no dañar al propio organismo (regulación inmunitaria). El fracaso en esta regulación contribuye a patologías como las enfermedades autoinmunes o la alergia. La ya citada memoria del sistema inmune es la base de la vacunación, que constituye un medio para instruir al sistema inmunitario y prepararlo para ataques posteriores.

1.1.2. Trastornos del sistema inmunitario

Cuando el sistema inmunitario falla, las enfermedades derivadas se pueden englobar en tres tipos:

- a) *Inmunodeficiencias*. La enfermedad por inmunodeficiencia se presenta cuando faltan uno o varios componentes del sistema inmunitario o éste no funciona correctamente.
- b) *Trastornos autoinmunitarios*. Se producen cuando el sistema inmunitario reconoce sus propios tejidos como ajenos y los ataca.

- c) *Trastornos alérgicos* (hipersensibilidad). Se presentan cuando el sistema inmunitario reacciona de forma exagerada a sustancias que normalmente no son dañinas, como el polen, el moho o ciertos alimentos.

1.1.3. La alergia como trastorno del sistema inmunitario

Las respuestas inmunitarias adaptativas en ocasiones son desencadenadas por antígenos no relacionados con agentes infecciosos. Una circunstancia en la cual ocurre esto es cuando se presentan reacciones inmunitarias nocivas en general conocidas como reacciones de hipersensibilidad en respuesta a antígenos “ambientales” (alérgenos) inocuos como polen, alimentos y fármacos. Las reacciones de hipersensibilidad fueron clasificadas en cuatro tipos por Coombs y Gell¹.

- Tipo I:
 - Hipersensibilidad mediada por IgE
 - El antígeno induce el enlace cruzado de la IgE fija en mastocitos y basófilos con liberación de mediadores vasoactivos
 - Las manifestaciones típicas incluyen anafilaxis sistémica y anafilaxis localizada como fiebre del heno (rinitis alérgica), asma, ronchas, alergias alimentarias y eccema

- Tipo II:
 - Hipersensibilidad citotóxica mediada por IgG o IgM
 - El anticuerpo dirigido contra antígenos de superficie celular media la destrucción celular por activación del complemento
 - Las manifestaciones típicas comprenden reacciones transfusionales, eritroblastosis fetal y anemia hemolítica autoinmunitaria

- Tipo III:
 - Hipersensibilidad mediada por inmunocomplejos
 - Los complejos antígeno-anticuerpo que se depositan en diversos tejidos inducen activación del complemento y reacción inflamatoria subsecuente mediada por infiltración masiva de neutrófilos
 - Las manifestaciones típicas abarcan reacción localizada de Arthus y reacciones generalizadas como enfermedad del suero, vasculitis necrosante, glomerulonefritis, artritis reumatoide y lupus eritematoso diseminado

- Tipo IV:
 - Hipersensibilidad mediada por células
 - Las células Th1 sensibilizadas liberan citocinas que activan macrófagos que median la lesión celular directa. Las células Th2 y los linfocitos T citotóxicos median reacciones similares
 - Las manifestaciones típicas incluyen dermatitis por contacto, reacciones tuberculares y rechazo de injerto

La alergia, el tipo de hipersensibilidad más común, suele equipararse a las reacciones de hipersensibilidad de tipo I, que son reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediato mediadas por anticuerpos IgE².

En la llamada fase de sensibilización, tras la exposición al alérgeno, las células presentadoras de antígeno toman el mismo y lo procesan. Los péptidos digeridos son presentados a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II a las células T nativas (Th0), que son de ese modo activadas diferenciándose a células Th2. La liberación de citoquinas (como IL-4 e IL-13) por parte de las células Th2 provoca un cambio de clase en las células B para que produzcan

anticuerpos IgE específicos contra el alérgeno, así como una expansión de células B de memoria. La activación de los linfocitos T en presencia de IL-4 incrementa la diferenciación a linfocitos Th2 (Figura 1.1, panel A)³.

Tras una segunda exposición al mismo alérgeno (fase inmediata de la reacción alérgica) (Figura 1.1, panel B), se produce un entrecruzamiento entre los anticuerpos IgE unidos al alérgeno y los receptores de alta afinidad para IgE (FcεRI) expresados en basófilos y mastocitos. Esta unión provoca su degranulación y la consecuente liberación de aminas vasoactivas (histamina), mediadores lipídicos (prostaglandinas y leucotrienos), quimioquinas y otras citoquinas, que en conjunto estimulan, entre otros efectos, la permeabilidad vascular y la contracción del músculo liso, induciendo muchos de los síntomas de las reacciones alérgicas (dificultad respiratoria, secreción de mucosidad...)⁴.

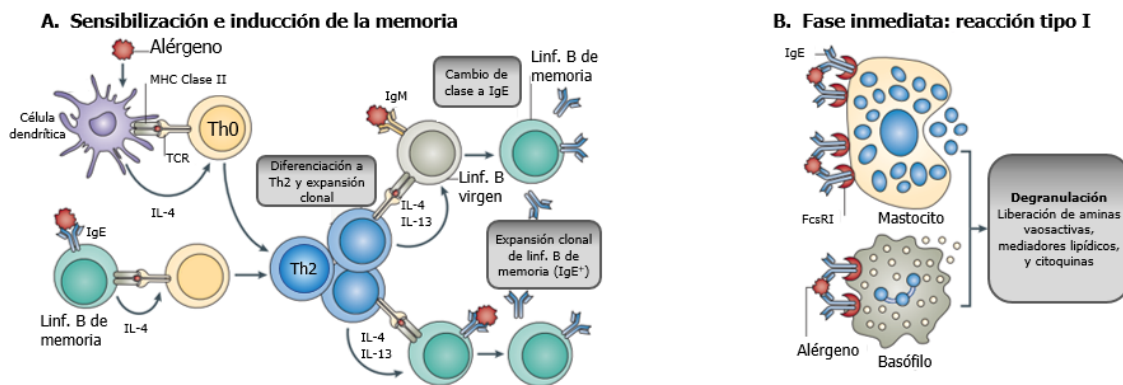


Figura 1.1. Mecanismo de la alergia. Panel A: Sensibilización al alérgeno y desarrollo de linfocitos T específicos y linfocitos B de memoria. Panel B: Reacción de hipersensibilidad de tipo I (fase inmediata de la reacción alérgica). Modificado de Larché y col.³.

La respuesta de IgE, una vez iniciada, puede ser amplificada por estos mismos basófilos y mastocitos, ya que cuando son activados por el antígeno que forma enlace cruzado con su IgE ligada a FcεRI, expresan el ligando de CD40 en la superficie celular y secretan IL-4. Por tanto, al igual que las células Th2, pueden impulsar el cambio de clase y la producción de IgE por los linfocitos B. Un objetivo del tratamiento de las alergias es bloquear este proceso de amplificación y evitar así que las reacciones alérgicas se vuelvan autopersistentes.

Las consecuencias de la activación de los mastocitos mediada por IgE dependen de la dosis del antígeno y de su vía de entrada; los síntomas fluctúan desde los estornudos irritantes de la rinitis alérgica cuando se inhala el polen hasta el colapso circulatorio potencialmente letal que se presenta en la anafilaxia general. La reacción alérgica inmediata causada por la desgranulación de los mastocitos se acompaña de una inflamación más persistente, que se conoce como la respuesta de fase tardía (Figura 1.2) y ocurre en casi un 50 % de los pacientes con una respuesta de fase inicial. En esta fase, la presentación local (facilitada por IgE) de antígenos por parte de las células dendríticas estimula la activación de los linfocitos T. Las reacciones de fase tardía se relacionan con una segunda fase de contracción del músculo liso mediada por las células T, que se caracteriza por edema persistente, y remodelación de los tejidos en la forma de hipertrofia del músculo liso (incremento en su tamaño por crecimiento celular) e hiperplasia (incremento en el número de células). La reacción de fase tardía y su secuela a largo plazo, la reacción alérgica crónica, que es en esencia una reacción de hipersensibilidad de tipo IV contribuye a una enfermedad muy grave a largo plazo, como el asma crónica. La fase crónica del asma se caracteriza por la presencia de citoquinas de Th1 (como IFN-γ) y citoquinas de Th2.

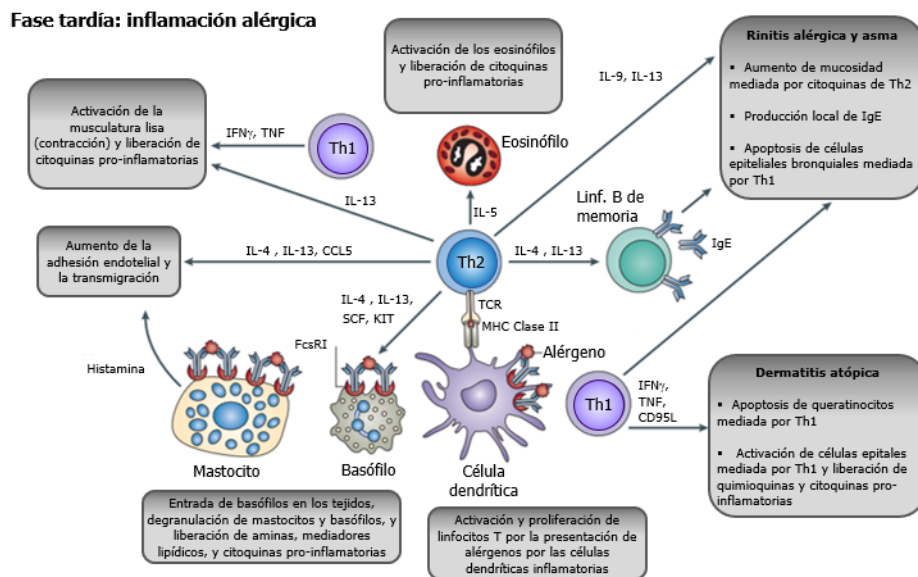


Figura 1.2. Inflamación alérgica (fase tardía de la reacción alérgica). Los linfocitos Th1, al producir interferón- γ (IFN γ) y factor de necrosis tumoral (TNF), contribuyen a la activación y apoptosis de los queratinocitos epiteliales, de las células epiteliales bronquiales y las células del músculo liso pulmonares. La activación de mastocitos y basófilos, que liberan histamina, quimioquinas y citoquinas también contribuyen a la reacción de fase tardía. Modificado de Larché y col.³.

1.1.4. Importancia económica de la alergia

Cuando los alérgenos penetran en el cuerpo por vía aérea (como puede ocurrir con el polen de plantas, ácaros del polvo o epitelio de animales) provocan la denominada rinitis alérgica, cuyos síntomas más frecuentes son: goteo y congestión nasal, ojos llorosos, rojos y con picazón (conjuntivitis alérgica), estornudos, tos, picazón en la nariz, el paladar o la garganta, ojeras (piel hinchada y de color azul debajo de los ojos) y fatiga.

La prevalencia global de la alergia, en general, y de la rinitis alérgica, la conjuntivitis alérgica, el asma relacionado con la alergia y la dermatitis atópica en concreto, está incrementando drásticamente, especialmente en países desarrollados^{5,6}. La rinitis alérgica, concretamente, afecta a alrededor de 500 millones de personas a nivel mundial⁷, y en Europa se estima que afecta a una cuarta parte de la población⁸.

Aunque los síntomas mencionados se podrían considerar leves o triviales, existen evidencias de que estos síntomas tienen un efecto perjudicial sobre la calidad de vida, el rendimiento escolar y la productividad en el trabajo⁹⁻¹¹. Además, cada vez hay más evidencias de que la rinitis alérgica puede derivar en enfermedades más graves como el asma. Se ha descrito que la rinitis alérgica aumenta 3 veces el riesgo de padecer asma en adultos^{12,13}. Incluso se considera que la rinitis alérgica y el asma pudieran ser diferentes expresiones de una misma enfermedad, la inflamación crónica de las vías respiratorias, ocurriendo ésta en las vías respiratorias superiores en el caso de la rinitis alérgica y en las vías respiratorias inferiores en el caso del asma¹⁴.

Tanto el asma como la rinitis alérgica provocan altos costes al sector sanitario, tanto en tratamientos farmacológicos como en atención médica para diagnosticar y tratar la enfermedad. El asma incluso podría requerir hospitalización en caso de episodios intensos.

El primer tratamiento farmacológico suele consistir en anti-histamínicos y corticosteroides, dirigidos principalmente a aliviar los síntomas, más que a tratar la respuesta inmune subyacente. Dependiendo del alérgeno causante y la sensibilidad a dicho alérgeno, el paciente podría requerir

tratamiento diario en temporadas concretas o a lo largo de todo el año. Una vez desarrollada la alergia, la remisión no suele ocurrir, lo que implica que el tratamiento sería de por vida¹⁵.

A pesar del relativamente bajo coste de los fármacos empleados para aliviar los síntomas, la alta prevalencia y la naturaleza crónica de la rinitis alérgica acaban suponiendo una carga económica elevada. En Europa, un estudio sueco analizó, mediante cuestionarios aleatorios, los costes directos e indirectos de rinitis alérgica en individuos entre las edades de 18 y 65 años¹⁶. Según este estudio, el tratamiento farmacológico, junto con las consultas médicas, así como las pérdidas en productividad debido al absentismo laboral (no acudir al trabajo) y al presentismo laboral (estar en el trabajo, pero con una menor capacidad laboral) costaron de media 961€ anuales por individuo. A nivel europeo, la Federación Europea de Alergia y Enfermedades de las Vías Respiratorias (EFA) calcula el gasto de la alergia, el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en 300 billones de euros anuales¹⁷.

1.1.5. Alergia a gramíneas

La alergia al polen (polinosis) es una de las alergias más comunes y podría afectar hasta a un 20 % de la población europea^{8,18}. Los pólenes de gramíneas son la mayor causa de polinosis en muchas partes del mundo debido a la alta producción de polen por parte de estas plantas, a la gran alergenicidad de sus pólenes y a su extensa distribución (20 % de la superficie vegetal del mundo)¹⁹. Aunque su frecuencia difiere regionalmente, es el polen alergénico más común también en Europa²⁰ siendo la causa más importante de alergia respiratoria estacional²¹, causando rinoconjuntivitis y asma.

Los alérgenos del polen pueden liberarse de los granos de polen y quedar en el aire que respiramos formando parte del aerosol atmosférico, pero los alérgenos también se pueden liberar de cualquier parte de la planta en respuesta a distintos fenómenos externos como una exposición a humedad elevada (por ejemplo, el periodo previo a una tormenta) o a una exposición a ciertos elementos que le resulten extraños, como diversos contaminantes^{22,23}.

Cuando el contacto los alérgenos sucede por inhalación provocan la ya mencionada rinitis alérgica (prurito intenso y estornudos, edema local que produce obstrucción de las vías nasales, secreción nasal e irritación de la nariz como consecuencia de la liberación de histamina). Cuando los alérgenos que se encuentran en el aire se depositan en la conjuntiva ocular, la reacción se denomina conjuntivitis alérgica.

Un síndrome más grave es el asma alérgica, que es desencadenada por la activación de las células cebadas de la submucosa de las vías respiratorias distales por la presencia de los alérgenos. Esto ocasiona constricción bronquial y un aumento en la secreción de líquido y mucosidad, dificultando aún más la respiración. Los pacientes con asma alérgica por lo general necesitan tratamiento y los ataques asmáticos pueden poner en riesgo su vida.

1.2. PHLEUM PRATENSE

1.2.1. Introducción

Phleum pratense (también conocida como hierba timotea, bohordillo, fleo, hierba macerguera, hierba triguera o membrillejo) es una gramínea perteneciente a la familia *Poaceae* (subfamilia *Pooideae*). La familia *Poaceae* consta de unas 9 000 especies y sus miembros se extienden prácticamente por todos los hábitats a nivel mundial²⁴. Son hierbas anuales y perennes, con una distribución cosmopolita: crecen en praderas, pastos y zonas de escombros, sobre suelos

cultivados y abandonados, a lo largo de las orillas de los caminos y de canales, es decir, casi en todas partes desde el nivel del mar hasta las zonas montañosas (Figura 1.3).

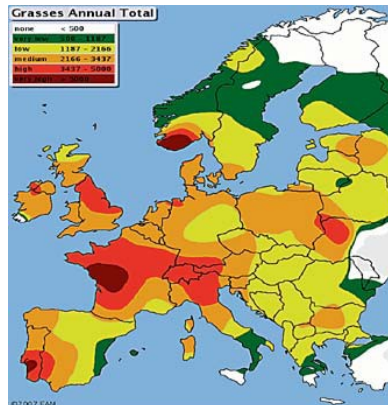


Figura 1.3. Exposición a polen de *Pooideae* en Europa. Se han empleado datos de la Red Europea de Aeroalérgenos (European Aeroallergen Network, EAN) durante los años 1997-2006, recopilando datos de 497 puntos de monitorización. Se muestra la intensidad del polen de gramíneas realizando la suma de los contajes a lo largo de la temporada de polinización. Fuente: Moingeon y col.²⁵.

Son plantas de polinización anemófila (es decir, la polinización sucede a través del traslado del polen por el viento) que florecen sobre todo durante la primavera y el verano y producen gran cantidad de polen, que en ocasiones se dispersa a largas distancias. La temporada del polen de gramíneas más típico en el Mediterráneo corresponde al mes de mayo, en Europa Noroccidental y Central a junio y en Europa Septentrional a julio.

Los granos de polen de las gramíneas son esferoidales a ovoides, heteropolares, monoporados y la mayoría miden entre 25 y 40 μm , aunque los de los cereales cultivados tienen un tamaño mucho mayor. Morfológicamente, los granos de polen de gramíneas pertenecientes a las diversas especies no pueden distinguirse entre sí (Red Española de Aerobiología)²⁶.

Las características alérgicas del polen de las gramíneas son bien conocidas, se han descrito y documentado extensamente y algunas fracciones alérgicas de extractos han sido purificadas y caracterizadas. Es el polen con mayor relevancia alérgica a nivel mundial y principal causa de polinosis (alergia al polen o fiebre del heno).

La subfamilia *Pooideae*, que incluye especies como *Phleum pratense*, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, son las más ubicuas en climas templados.



Figura 1.4. *Phleum pratense*. Reproducción del dibujo del botánico sueco C. A. M. Lindman (1856-1928). Fuente: <http://runeberg.org/nordflor/pics/471.jpg>

En España, del género *Phleum* hay 6 especies, siendo las más comunes *Phleum pratense* y *Phleum phleoides*.

La especie *Phleum pratense* es una planta perenne con una inflorescencia cilíndrica y apretada formada por numerosas espiguillas (Figura 1.4). Es comúnmente empleada para alimento del ganado y, en particular, como heno para caballos y mascotas domésticas (conejos, conejillos de Indias o chinchillas).

1.2.2. Alérgenos de *Phleum pratense*

La alergenicidad es la capacidad de una determinada molécula (alérgeno), de inducir una respuesta inmunológica del tipo IgE en determinados individuos susceptibles. Los alérgenos más importantes son proteínas o polipéptidos, aunque también pueden actuar como alérgenos polisacáridos, glicoproteínas y lipoproteínas. La alergenicidad depende de múltiples factores no completamente dilucidados, pero el tamaño de la molécula, su solubilidad, su estructura espacial y su estabilidad, contribuyen a su potencia alérgica.

La primera nomenclatura de los alérgenos de la Organización Mundial de la Salud fue publicada en 1986²⁷. Desde entonces se han realizado numerosas revisiones^{28,29} siendo la más reciente de 2018³⁰. Esta nomenclatura establece que los alérgenos se nombran con las tres primeras letras del género, la primera letra de la especie y un número arábigo. Alérgenos de la misma fuente se clasifican en grupos bioquímicos, designados con un número arábigo que en general indica el orden cronológico de su identificación. En la medida de lo posible, a alérgenos de diferentes especies (relacionadas a nivel taxonómico) que pertenezcan a la misma familia bioquímica de proteínas se les asignará el mismo número.

Atendiendo a criterios de prevalencia, los alérgenos se clasifican en “alérgeno mayor” o “alérgeno menor” en base a si más o menos del 50 % de los pacientes testados presentan IgE específicas contra el mismo respectivamente^{29,31}.

Los alérgenos de las diferentes especies de gramíneas presentan grandes similitudes físico-químicas que explican la gran reactividad cruzada entre ellas.

Según la lista oficial del Subcomité de Nomenclatura de Alérgenos de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (I.U.I.S.), existen reconocidos en la actualidad 9 alérgenos de *Phleum pratense*: Phl p 1, Phl p 2, Phl p 4, Phl p 5, Phl p 6, Phl p 7, Phl p 11, Phl p 12 y Phl p 13 (<http://www.allergome.org>). A continuación, se describen los alérgenos de *Phleum pratense* clasificados según su grupo.

Grupo 1

Phl p 1^{24,32-35} es un alérgeno mayor del polen del grupo 1, los determinantes alérgenos predominantes en gramíneas. Esta familia de alérgenos está presente en todas las especies de gramíneas³⁶ con un porcentaje de reconocimiento de alrededor del 90 %³⁵ y una alta reactividad cruzada.

Los alérgenos del grupo 1 de gramíneas son proteínas glicosiladas que muestran entre el 60 % y 70 % de identidad de secuencia con las expansinas, una familia de proteínas implicadas en la remodelación de la pared celular (induciendo la extensibilidad y el relajamiento de la tensión en las paredes celulares de las plantas).

Phl p 1 es una beta-expansina de 27 kDa (Figura 1.5) que presenta un 85 % de identidad de secuencia y más de un 90 % de homología con Lol p 1 (*Lolium perenne*, ballico) y Hol l 1 (*Holcus lanatus*)³⁷. Phl p 1 contiene la mayor parte de los epítomos IgE y linfocitos T de los alérgenos del grupo 1 de gramíneas^{33,38}.

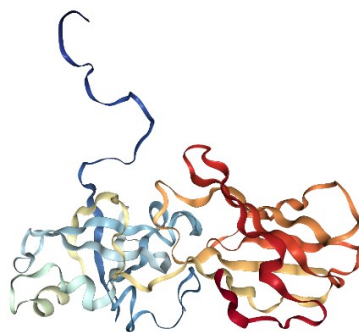


Figura 1.5. Estructura tridimensional de Phl p 1. Resuelta mediante cristalografía de rayos X (DOI: 10.2210/pdb1N10/pdb).

Grupo 2

Phl p 2^{24,39-43} (Figura 1.6) pertenece a una amplia familia de alérgenos menores denominada “grupo 2/3” reconocidos por el 40-60 % de los pacientes sensibilizados.

En este grupo se incluyen proteínas no glicosiladas de 10 a 12 kDa (unos 95-98 aminoácidos) que presentan un 85-90 % de identidad de secuencia entre especies. Los alérgenos de los grupos 2 y 3 comparten un alto grado de homología de secuencia con el extremo C-terminal de los alérgenos del grupo 1, pero difieren lo suficiente como para presentar diferente reconocimiento por parte de los anticuerpos²⁴.



Figura 1.6. Estructura tridimensional de Phl p 2. Resuelta mediante cristalografía de rayos X (DOI: 10.2210/pdb1WHO/pdb).

Grupo 4

Phl p 4⁴⁴⁻⁴⁶ pertenece al grupo 4 de alérgenos de gramíneas. Los alérgenos de este grupo se identificaron originalmente en *P. pratense*, *L. perenne* y *D. glomerata*. Son glicoproteínas básicas de entre 50 y 67 kDa.

El 80 % de los individuos sensibilizados al polen de gramíneas muestran reactividad IgE al grupo 4⁴⁶. El 10-15 % de su peso está compuesto por carbohidratos, por lo que parte de la respuesta IgE podría estar directamente relacionada con esta parte de la estructura de la proteína. Este grupo de proteínas se localiza en la pared del polen y, en el caso de la hierba timotea (Phl p 4) y el polen de abedul, también en el citoplasma.

Grupo 5

Phl p 5^{24,33,47-49} (Figura 1.7) es un alérgeno mayor y uno de los más reactivos de los alérgenos del grupo 5 provocando rinitis alérgica y asma bronquial en los pacientes alérgicos al polen. Los

alérgenos del grupo 5 parecen ser exclusivos de la subfamilia *Pooideae*. Se ha encontrado una prevalencia de sensibilización del 65 al 85 % en individuos alérgicos a gramíneas en regiones templadas^{46,50,51}. Muestran un tamaño similar al grupo 1, con un tamaño aparente de entre 27 y 33 kDa en SDS-PAGE.

Se han descrito dos isoformas de Phl p 5, denominadas "a" y "b" con una divergencia de secuencia de 25-30 %^{24,52}. Phl p 5b (de 26.1 kDa y con un pI de 5.99), pese a ser más pequeña que Phl p 5a (28.7 kDa, con un pI de 6.89) muestra un epítipo de unión a IgE más que Phl p 5a.

Se han resuelto las estructuras del extremo C-terminal de Phl p 5b y de Phl p 5a por cristalografía de rayos X y por resonancia magnética nuclear respectivamente^{53,54}. Cada fragmento de proteína forma un dominio globular plegado consistente en 4 hélices en una topología similar a la del citocromo c. La estructura cristalizada del fragmento de Phl p 5b muestra un dímero, unido covalentemente por un puente disulfuro establecido entre dos residuos de cisteína.

El papel biológico y funcional de los alérgenos del grupo 5 todavía se desconoce, aunque podrían ser ribonucleasas⁵⁵.

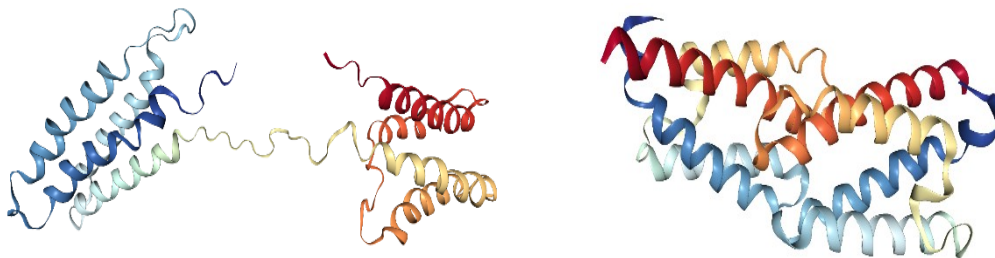


Figura 1.7. Estructura tridimensional de Phl p 5. Panel izquierdo: Phl p 5a (DOI: 10.2210/pdb2M64/pdb). Panel derecho: Phl p 5 b (DOI: 10.2210/pdb1L3P/pdb).

Grupo 6

Phl p 6 es una proteína no glicosilada con punto isoelectrico ácido de un tamaño aparente de unos 11 kDa. Pertenece al grupo 6 de alérgenos del polen, cuyos miembros sólo han sido identificados en *Phleum pratense* y *Poa pratensis*. Phl p 6 tiene homología con los alérgenos del grupo 5, con un 60 % de identidad con el extremo C-terminal de Phl p 5 (con regiones incluso del 90 % de identidad)⁵⁶. El análisis de Phl p 6 recombinante revela una estructura secundaria alfa-helicoidal, en concordancia con la estructura cristalizada de la secuencia C-terminal homóloga de Phl p 5b^{54,57}. Es reconocido por el 60-70 % de los pacientes sensibilizados a polen de gramíneas, por lo que es considerado alérgeno mayor. Debido a su semejanza, es posible que Phl p 5 y Phl p 6 potencien la respuesta inmune entre sí y que el reconocimiento de Phl p 6 por parte de los anticuerpos IgE represente, en parte, reactividad cruzada con Phl p 5.

Grupo 7

Phl p 7 (Figura 1.8) es un alérgeno menor reconocido por aproximadamente un 10 % de los pacientes sensibilizados. Su masa teórica es de 8.6 kDa y su punto isoelectrico teórico es 4.2. Su secuencia comprende dos dominios fijadores de calcio (2-EF-hand), por lo que se ha definido como una nueva clase de proteínas 2-EF-hand denominadas polcalcinas⁵⁸.

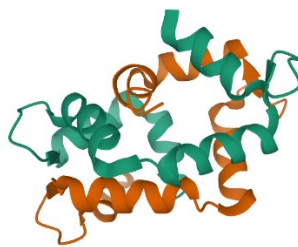


Figura 1.8. Estructura tridimensional de Phl p 7. Resuelta mediante cristalografía de rayos X (DOI: 10.2210/pdb1K9U/pdb).

Grupo 11

Phl p 11 pertenece al grupo 11 de alérgenos del polen, y es una glicoproteína de 18 kDa con un contenido en carbohidratos que constituye el 8 % de su peso molecular. Phl p 11 presenta similitud estructural con el inhibidor de tripsina de la soja, aunque carece de actividad enzimática⁵⁹.

Phl p 11 ha sido clonado y producido como proteína recombinante en *E. coli*⁶⁰ demostrando actividad alérgica. La secuencia cDNA codifica para una proteína de 143 aminoácidos con un 95 % de identidad de secuencia con Lol p 11. La prevalencia de sensibilización a Lol p 11 es del orden del 66 % en pacientes alérgicos al polen de gramíneas, de los que aproximadamente un tercio también muestra unión de IgE contra carbohidratos, lo que sugiere que una porción de la respuesta IgE a Lol p 11 está dirigida contra la porción glucídica del alérgeno.

Grupo 12

Los alérgenos del grupo 12 son miembros de la familia de las profilinas, proteínas de unión a actina involucradas en el equilibrio dinámico de ensamblaje del citoesqueleto de actina. Esta familia (muy conservada) está presente en todas las células eucariotas⁶¹. Muestran un 15-30 % de unión a IgE en pacientes alérgicos al polen^{19,46}.

La secuencia de cDNA de Phl p 12, originalmente denominada Phl p 11^{62,63}, codifica para una proteína de 131 aminoácidos con un peso molecular de 14.2 kDa y un pI de 5.0. Ha sido expresado en *E. coli* y la proteína recombinante ha demostrado ser comparable a su homólogo natural con respecto a su capacidad de fijación de anticuerpos IgE⁶⁴.

Grupo 13

Phl p 13 pertenece al grupo más recientemente identificado⁶⁵. Es una proteína de 55 kDa, capaz de fijar IgE en el 50 % de los pacientes sensibilizados a polen de gramíneas. La secuencia de aminoácidos de Phl p 13 revela una identidad de alrededor del 70 % con la poligalacturonasa del polen de *Zea mays*⁶⁵. Las poligalacturonasas son enzimas degradadoras de pectinas involucradas en el recambio y remodelado de la pared celular.

Resumen

En la Tabla 1.1 se resumen las funciones biológicas, masa relativa y frecuencia de unión a IgE de los alérgenos de *Phleum pratense*.

Tabla 1.1. Resumen de los alérgenos de *Phleum pratense*. Se muestra la función biológica, la masa relativa (Mr) y la frecuencia de unión a IgE de cada alérgeno de *Phleum pratense*.

| Alérgeno | Alérgeno mayor | Alérgeno menor | Función biológica | Mr (kDa) | Frecuencia de reconocimiento IgE (%) |
|----------|----------------|----------------|-------------------|----------|--------------------------------------|
| Phl p 1 | √ | - | Beta-expansina | 27 | 96 % |
| Phl p 2 | - | √ | - | 10-12 | 40-60 % |
| Phl p 4 | √ | - | - | 55 | 80% |
| Phl p 5 | √ | - | Ribonucleasa | 32 | 80 % |
| Phl p 6 | √ | - | - | 11 | 60-70 % |
| Phl p 7 | - | √ | Polcalcina | 6-8.6 | 10 % |
| Phl p 11 | - | √ | - | 20 | - |
| Phl p 12 | - | √ | Profilina | 14 | 15-30 % |
| Phl p 13 | - | √ | Poligalacturonasa | 55 | 50 % |

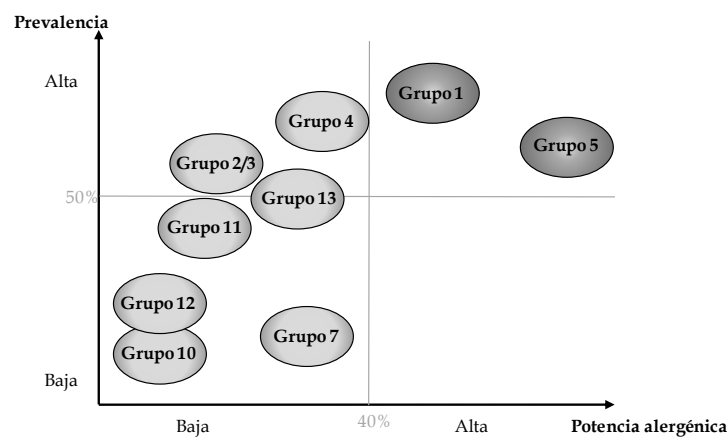


Figura 1.9. Prevalencia y potencia alérgica de los grupos de alérgenos de gramíneas. Se muestran los alérgenos de gramíneas ordenados según su potencia alérgica (eje de abscisas) y su prevalencia (eje de ordenadas).

En la Figura 1.9 se constata que los grupos 1 y 5 de gramíneas son los que presentan la mayor potencia alérgica, así como la mayor prevalencia, por lo que constituyen el objetivo clínico prioritario a la hora de tratar la alergia a gramíneas.

1.3. INMUNOTERAPIA

1.3.1. Introducción

El objetivo de la inmunoterapia no sólo es la reducción de los síntomas y de la necesidad de tratamiento farmacológico, sino la completa supresión de la reacción alérgica que provoca la enfermedad, frenando de este modo tanto el avance de la enfermedad como el desarrollo de enfermedades asociadas (por ejemplo, asma).

La inmunoterapia, también conocida como inmunoterapia específica (ITE), inmunoterapia específica con alérgeno (ITA), desensibilización o vacuna para alergia⁶⁶, consiste en la administración de cantidades crecientes del alérgeno (normalmente extractos alérgicos completos) que provoca la alergia en el paciente, hasta una dosis máxima que se mantiene durante varios años (normalmente de 3 a 5 años) con el objetivo de modular la respuesta inmune mediada por IgE. El origen se remonta a principios del siglo XX, cuando Leonard Noon en 1911⁶⁷ publica un trabajo en el que describe la eficacia de inyecciones repetidas de un extracto de polen para tratar a pacientes con fiebre del heno.

Las vías de administración más frecuentes son: subcutánea (SCIT, del inglés *subcutaneous immunotherapy*)⁶⁸ y sublingual (SLIT, del inglés *sublingual immunotherapy*)⁶⁹, si bien existen otras vías alternativas en fase experimental como la intradérmica⁷⁰.

1.3.2. Mecanismo de la inmunoterapia

Las células presentadoras de antígeno juegan un papel fundamental en el mecanismo de la inmunoterapia, ya que absorben y procesan los alérgenos para inducir una reacción inmune específica al alérgeno. En condiciones de alta concentración de antígeno (inmunoterapia) las células presentadoras de antígeno promueven un desvío desde una respuesta Th2 (que sería la respuesta inmune característica de la alergia) hacia una respuesta Th0/Th1, con la consecuente elevación de los niveles de IFN- γ (Figura 1.10)⁷¹.

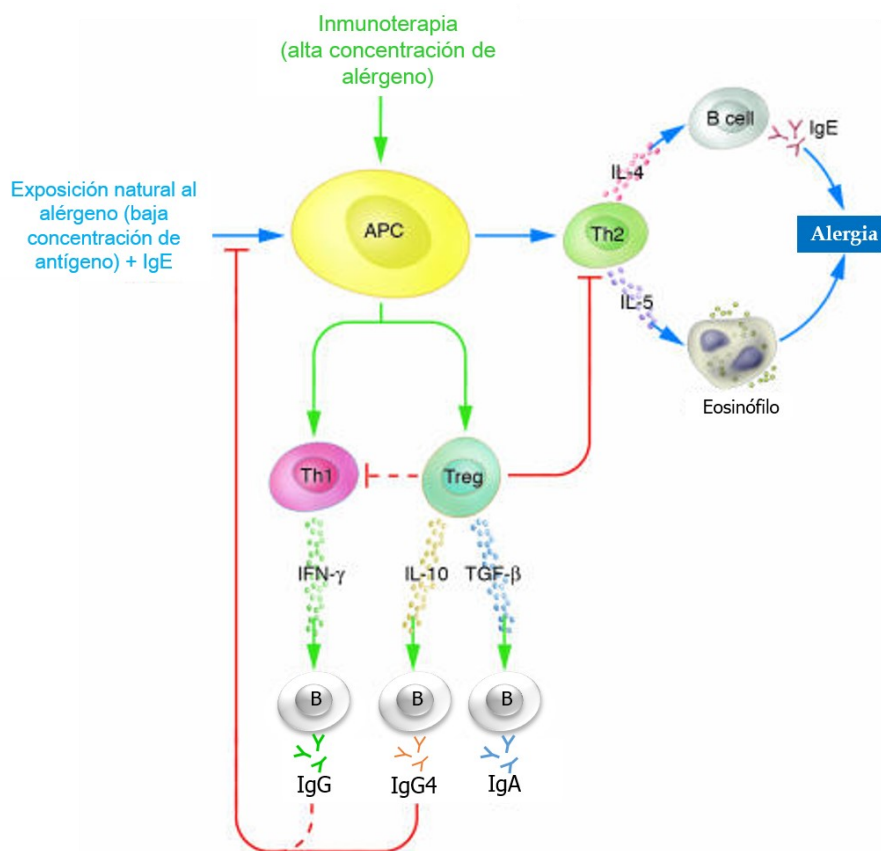


Figura 1.10. Mecanismo de acción de la inmunoterapia específica. Las flechas azules representan la vía de la respuesta inmune a una exposición natural al alérgeno (baja concentración de antígeno e IgE). Las líneas rojas sólidas representan inhibición (altas dosis de antígeno). Las líneas punteadas representan posibles mecanismos de acción. Tomado de Robinson, Larché, & Durham, 2004⁷².

De este modo, en posteriores exposiciones naturales al alérgeno, se inhibe la respuesta atópica de las células Th2. Este descenso en la activación y proliferación de las células Th2 provoca una menor producción de IL-4, con el consecuente descenso en la producción de inmunoglobulinas IgE por parte de las células B, así como una menor producción de IL-5, suprimiéndose así la activación de eosinófilos, basófilos y mastocitos⁷³.

Este desvío se ve reforzado además por la activación de células T reguladoras (Treg) productoras de IL-10 y TGF- β . Esto conlleva la producción de anticuerpos IgG, IgG4 e IgA. Los

anticuerpos específicos de alérgeno IgG/IgG4 bloquean la captación del antígeno (mediada por IgE) por parte de las células presentadoras de antígeno, suprimiendo de este modo la reacción alérgica (respuesta Th2 dependiente de IgE). Actúan además como anticuerpos bloqueantes inhibiendo el entrecruzamiento del antígeno con los anticuerpos IgE unidos a los receptores de los mastocitos, previniendo así la degranulación y la liberación de histamina⁷⁴.

En resumen, las células T reguladoras suprimirían la respuesta alérgica (de manera directa o indirecta) a través de los siguientes mecanismos⁷³:

- Inhibición de mastocitos, basófilos y eosinófilos
- Inhibición de inflamación de los tejidos
- Inhibición de la producción de mucosidad
- Inhibición de las células dendríticas inflamatorias
- Inhibición de producción de anticuerpos IgE e inducción de IgG4 (por parte de linfocitos B).

1.3.3. Limitaciones e inconvenientes de la inmunoterapia

La inmunoterapia, como ya hemos comentado, se basa en la aplicación a pacientes alérgicos de concentraciones crecientes de extractos alérgicos completos. El uso de extractos puede conllevar, entre otros, problemas de heterogeneidad de la muestra, degradación proteica, contaminaciones, toxicidad y otros efectos secundarios.

Los extractos alérgicos son mezclas complejas de biomoléculas, principalmente proteínas, glicoproteínas y carbohidratos, que se obtienen a partir de aquellas materias primas causantes de la alergia. La composición de los extractos alérgicos dependerá, por tanto, de la materia prima o fuente de partida. Se ha observado que el contenido, la concentración y la proporción de cada alérgeno del extracto varía en gran medida debido a diversos factores⁷⁵. Por ejemplo, el contenido alérgico en el polen varía dependiendo del lugar de procedencia, y de factores medioambientales como la época del año o la exposición a contaminación⁷⁶. Varios estudios han demostrado que extractos alérgicos de diferentes fabricantes contienen cantidades variables de alérgenos e incluso carecen de algunos alérgenos importantes^{77,78}. El contenido en Phl p 1, por ejemplo, suele ser bastante bajo, con lo que el alérgeno más frecuentemente reconocido por los pacientes, Phl p 1, apenas está representado en los extractos alérgicos de gramíneas. El otro alérgeno más frecuentemente reconocido en pacientes alérgicos a gramíneas, Phl p 5, muestra la mayor variabilidad en contenido (llegando hasta una diferencia de 20 veces de unos extractos a otros).

La presencia de proteasas en el extracto alérgico es otro problema ya que puede provocar la degradación de alérgenos y la modificación, por tanto, de la actividad alérgica y la inmunogenicidad del extracto. Los inhibidores de proteasas, que podrían solventar este problema, presentan efectos secundarios que desaconsejen su uso, por lo que no se pueden emplear en los extractos.

Algunos alérgenos son tóxicos y a altas concentraciones podrían inducir reacciones inflamatorias en sujetos no sensibilizados⁷⁹.

Los extractos alérgicos pueden contener contaminantes de otras fuentes alérgicas. Por ejemplo, el polen de una especie de planta en concreto podría estar contaminado con polen de otras especies o incluso con hongos. Se ha descrito la presencia de alérgenos de ácaros del polvo en extractos alérgicos de caspa de perro⁸⁰.

Por último, la administración de alérgenos a pacientes alérgicos puede inducir efectos adversos, que en el peor de los casos podría conllevar un shock anafiláctico⁸¹.

Por todo lo anteriormente mencionado, la evolución de la inmunoterapia requiere sustituir los extractos naturales por otros productos más seguros, eficaces y reproducibles, que permitan llegar a dosis máximas o efectivas.

1.4. VACUNAS RECOMBINANTES HIPOALERGÉNICAS

1.4.1. Ventajas

La fabricación de productos farmacéuticos para inmunoterapia requiere que éstos sean específicos, seguros, reproducibles, eficaces e inmunogénicos.

Desde hace décadas, se han abordado diferentes soluciones a los inconvenientes y limitaciones de la inmunoterapia con extractos alérgicos. Por ejemplo, se emplea el hidróxido de aluminio como adyuvante en vacunas para reducir el riesgo de desarrollo de reacciones adversas tras la aplicación de extractos alérgicos. Por una parte, el hidróxido de aluminio, al unirse al antígeno, actúa como depósito (efecto *depot*) de modo que la liberación del antígeno ocurre lentamente y prolonga el tiempo de exposición entre el antígeno y las células presentadoras de antígeno. Por otra parte, el antígeno, que es una molécula soluble, pasa a encontrarse embebido en una partícula de gran tamaño, lo cual facilita la fagocitosis por parte de las células presentadoras de antígeno⁸². No obstante, el uso de hidróxido de aluminio minimiza, pero no elimina, las limitaciones asociadas al uso de extractos alérgicos.

Las vacunas recombinantes son la mejor alternativa al uso de extractos alérgicos porque al realizarse en condiciones experimentales definidas, su producción es más reproducible, con una calidad farmacológica óptima y consistente. Una vacuna preparada a partir de proteínas recombinantes, al ser moléculas perfectamente definidas y con alta pureza, permite controlar la composición alérgica con el alérgeno de interés a concentraciones conocidas, excluyéndose las proteínas no alérgicas y otras biomoléculas que, presentes en extractos, pueden provocar efectos secundarios adversos o nuevas sensibilizaciones. La estandarización de la vacuna estaría totalmente definida y las dosis terapéuticas controladas.

Los alérgenos recombinantes, sin embargo, contienen los mismos epítopos reconocidos por las células T y las IgE que los alérgenos naturales, de modo que, aunque tendrán los mismos efectos de inmunización, también podrían inducir los mismos efectos secundarios que los alérgenos naturales. Para solventar esta eventualidad se han desarrollado formas hipoalérgicas de algunas proteínas alérgicas empleando herramientas de biología molecular para modificar la secuencia de aminoácidos y por tanto la estructura terciaria de dichas proteínas, concretamente de los epítopos IgE⁸³. Diversos estudios han demostrado que la conformación intacta de los alérgenos es crucial para la unión de los anticuerpos IgE, de modo que la alteración de la estructura tridimensional conllevaría una reducción de la capacidad de unión de IgE⁸⁴.

Se han seguido diferentes estrategias para diseñar estas formas hipoalérgicas: fragmentación^{85,86}, oligomerización⁸⁷, híbridos^{88,89}, mutaciones y/o deleciones⁹⁰⁻⁹², desnaturalización⁹³. El objetivo de todas estas modificaciones es que las nuevas moléculas mantengan la mayor parte de los epítopos específicos de alérgeno de los linfocitos T (induciendo la respuesta IgG y manteniendo así la inmunogenicidad), pero que induzcan una menor producción de anticuerpos IgE (reduciendo así la alergenidad) que la versión natural. La reducción en la alergenidad permitiría administrar dosis más altas durante el tratamiento de inmunoterapia, y lograr, con un menor número de inyecciones, una mayor producción de anticuerpos IgG específicos de alérgeno.

1.4.2. Fabricación GMP de una vacuna recombinante

Las proteínas recombinantes que tienen como objetivo ser empleadas como productos farmacológicos se deben fabricar, bajo estándares de Buenas Prácticas de Fabricación (GMP, *Good*

Manufacturing Practice), existiendo diversos sistemas para su producción: bacterias, levaduras, células de insecto o células de mamífero. El sistema más extendido es *Escherichia coli* por la facilidad y el bajo coste de producción en este sistema de altas cantidades de proteína. Tras diseñar el vector de expresión e introducirlo en el sistema elegido, se genera el banco celular maestro (MCB, *Master Cell Bank*) a partir de un solo clon transformado y se conserva congelado en glicerol. Esto garantiza la reproducibilidad de la producción ya que se parte del mismo lote de células para la fabricación de múltiples lotes del producto farmacéutico.

El proceso industrial de fabricación de una vacuna recombinante se divide en dos etapas principales: *Upstream Process* (USP) y *Downstream Process* (DSP).

La primera etapa (USP) incluye el crecimiento celular, la expresión de la proteína y recolección de la biomasa. Para el crecimiento bacteriano, lo más común es un cultivo de alta densidad en modo semicontinuo en un fermentador o biorreactor, llegándose a alcanzar densidades ópticas para *E. coli* de más de 100 UA.

La segunda etapa (DSP) incluye la purificación de la proteína recombinante mediante diversas etapas cromatográficas como, por ejemplo, intercambio iónico, interacción hidrofóbica o tamizado molecular.

Durante el desarrollo del proceso de producción y purificación de la proteína recombinante, así como una vez el proceso ha sido desarrollado y se fabrican lotes comerciales, la proteína final purificada, así como los productos intermedios durante la producción, son analizados mediante diversas técnicas analíticas para comprobar sus atributos de calidad (identidad, cantidad, homogeneidad, estabilidad, estado de agregación, contenido en endotoxinas, proteínas de la célula hospedadora, etc.

La industria farmacéutica, en sus procesos de fabricación y para asegurar la calidad de los productos farmacéuticos, ha evolucionado desde la calidad por ensayo (QbT, *Quality by Test*) hacia la calidad desde el diseño (QbD, *Quality by Design*) que fue propuesta por primera vez en 1992 por Joseph Juran en su libro "*Juran on quality by design: the new steps for planning quality into goods and services*".

La Calidad desde el Diseño (QbD) es una estrategia de fabricación que basa la calidad del producto, no tanto en la comprobación de sus especificaciones, como en un conocimiento profundo del producto y del proceso de fabricación y un control exhaustivo del proceso, apoyados en conocimientos científicos sólidos y el análisis de riesgos⁹⁴. Es por ello que requiere comprender cómo las variables del proceso y la formulación influyen en la calidad final del producto.

La Calidad desde el Diseño, en el sector farmacéutico, identifica las características que son críticas para la calidad desde la perspectiva del paciente, las traduce en los atributos que el producto farmacológico debe poseer, y establece cómo se pueden modificar los parámetros críticos de proceso para producir sistemáticamente un producto farmacológico con las características deseadas.

La estrategia incluye los siguientes principios⁹⁵:

- Definir el perfil de calidad del producto (QTPP, *Quality Target Product Profile*)
- Diseñar el producto y los procesos de fabricación
- Identificar los atributos críticos de calidad (CQAs, *Critical Quality Attributes*) y los parámetros críticos de proceso (CPPs, *Critical Process Parameters*)
- Controlar el proceso de fabricación para mantener una calidad constante a lo largo de la vida del producto.

El perfil de calidad del producto consiste en un resumen de las características de calidad del producto farmacéutico que idealmente se alcanzarán para asegurar que la calidad deseada y, por tanto, la seguridad y la eficacia del mismo se consiguen.

Los atributos críticos de calidad (CQAs) son las propiedades o características físicas, químicas, biológicas o microbiológicas de un producto, que deben encontrarse dentro de un determinado límite o intervalo, que asegure la calidad deseada para el producto.

Los parámetros críticos de proceso (CPPs) son los parámetros de proceso cuya variabilidad tiene impacto en un atributo crítico de calidad y que por tanto deben ser monitorizados o controlados para asegurar que el proceso produce la calidad deseada en el producto.

Un análisis de riesgos apropiado, que permita identificar cómo afecta la variabilidad de las variables de entrada (como los parámetros críticos de proceso) sobre el producto final, determinará el espacio de diseño en el que la fabricación del producto permite obtener con garantías los atributos críticos de calidad del producto final. Los resultados que definan los límites del espacio de diseño se conseguirán a partir de un diseño estadístico de experimentos, (DoE, *Design of Experiments*), dentro de un estudio multivariante que debe considerar las interacciones entre las variables críticas de entrada.

El diseño de experimentos (DoE) consiste en modelos estadísticos clásicos cuyo objetivo es averiguar si unos determinados factores influyen en una variable de interés y, si existe influencia de algún factor, cuantificar dicha influencia. Se denomina factor a cualquier variable de interés para el experimentador cuyo posible efecto sobre la respuesta se quiere estudiar. Los niveles de un factor son los tipos o grados específicos del factor que se tendrán en cuenta en la realización del experimento.

1.4.3. Vacuna recombinante hipoalérgica para el tratamiento de la alergia a gramíneas

El objetivo de este trabajo fue el diseño de un proceso robusto para fabricar una vacuna recombinante hipoalérgica para el tratamiento de alergia a gramíneas, basada en un híbrido de los alérgenos mayores Phl p 1 y Phl p 5 denominado QG31.

En el caso de fuentes alérgicas complejas que contienen varios alérgenos mayores, como el caso del polen de gramíneas, el hecho de fabricar una vacuna híbrida compuesta de fragmentos hipoalérgicos derivados de los alérgenos conlleva múltiples ventajas ya que permite incrementar la inmunogenicidad de la vacuna con una menor cantidad de alérgeno.

Se decidió partir de los alérgenos Phl p 1 y Phl p 5, debido a que, como se comentó en el apartado "1.2.2. Alérgenos de *Phleum pratense*", éstos son los alérgenos predominantes en gramíneas, con la mayor prevalencia y potencia alérgica (Figura 1.9).

Los beneficios que podría reportar esta vacuna con respecto a vacunas basadas en complejos extractos alérgicos de gramíneas son:

- **Especificidad**, al contener sólo las proteínas a la que el individuo es alérgico.
- **Reproducibilidad**, al ser el principio activo expresado por una bacteria (*E. coli*) siempre con la misma secuencia de aminoácidos y por tanto con idéntica estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.
- **Seguridad**, al tener características hipoalérgicas.
- **Inmunogenicidad**, al tratarse de una proteína quimérica formada por la fusión de dos alérgenos. Su mayor tamaño conllevará una mayor inmunogenicidad que los alérgenos naturales por separado, dando lugar a una más acentuada respuesta de formación de anticuerpos específicos IgG bloqueantes, claves en el mecanismo de acción de la inmunoterapia.

OBJETIVOS

La alergia al polen (polinosis) es una de las alergias más comunes que afecta hasta a un 20 % de la población europea, siendo los pólenes de gramíneas los principales causantes de polinosis. Para el tratamiento de la alergia, la inmunoterapia específica con alérgenos (ITA) es la única terapia modificadora de la enfermedad con efectos clínicos (mejoría de los síntomas) de larga duración. Sin embargo, los efectos secundarios de la administración de extractos alérgenos limitan la aplicación extensiva de este tipo de inmunoterapia.

El objetivo de este trabajo ha sido la generación de una novedosa vacuna para tratar la alergia al polen de gramíneas, a través del desarrollo de una inmunoterapia de segunda generación basada en proteínas recombinantes mediante la estrategia de híbridos hipoalérgenos. La inmunoterapia basada en principios activos puros y debidamente caracterizados, permitirá una práctica clínica más segura y eficaz.

Dentro del objetivo general de obtener el principio activo de una vacuna contra la alergia a gramíneas, se especifican los siguientes objetivos:

- Diseñar la secuencia primaria de una proteína recombinante híbrida (QG31), basada en la secuencia de los alérgenos mayores Phl p 1 y Phl p 5 que, manteniendo la respuesta inmunogénica, presente una respuesta alérgica atenuada.
- Desarrollar y cualificar los métodos analíticos que permitan el desarrollo del proceso de producción de la molécula de interés, así como su posterior control cuando dicho proceso haya sido definido, así como la caracterización de la molécula QG31 final.
- Generar un banco celular y desarrollar un sistema de expresión para la producción, a gran escala, de biomasa con la proteína QG31 sobreexpresada.
- Desarrollar, con un enfoque QbD (calidad por diseño, Quality by design), un robusto proceso de sobreexpresión y purificación de QG31 con un alto rendimiento, así como compatible con los requerimientos de pureza y contenido en endotoxinas formulados por la Pharmacopoeia.
- Evaluar las características bioquímicas, inmunogénicas y alérgicas de la proteína purificada QG31 para certificar su idoneidad como sustancia activa de una vacuna contra la alergia de gramíneas.

2

MATERIALES Y MÉTODOS

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En este capítulo se describe el fundamento teórico de los métodos analíticos que han sido empleados en el desarrollo y obtención de la molécula QG31.

2.1. TÉCNICAS RELACIONADAS CON LA SÍNTESIS DE PROTEÍNA. ETAPA USP (UPSTREAM PROCESS)

2.1.1. Banco celular

Tras su diseño inicial, la síntesis y optimización de la secuencia de QG31 fue realizada por GeneArt Gene Synthesis (ThermoFisher Scientific). Esta secuencia codificante de QG31 se subclonó en el plásmido pET26b(+) (Novagen, Merck Millipore) (Figura 2.1) en los sitios de restricción *Nde* I y *Eco*RI. El plásmido de expresión resultante se transformó en la cepa de *E. coli* BL21(DE3), generando la cepa productora BL21(DE3)/pET26b_QG31, que se utilizó en la fase de prueba de concepto (PoC) y en la primera fase de desarrollo. También se generó una copia sin el inserto de QG31 que se subclonó en el mismo plásmido con el objetivo de emplearla como control negativo de la expresión.

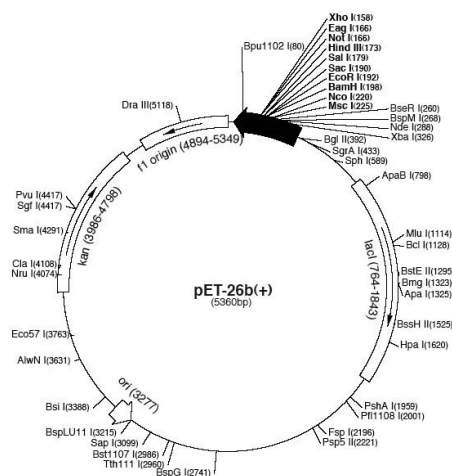


Figura 2.1. Mapa del plásmido pET-26b(+).

En la segunda fase de desarrollo, el gen codificante de QG31 fue insertado por ATUM (www.atum.bio), en el plásmido pJ411, un plásmido de alto número de copias que contiene el promotor inducible T7 y el gen de resistencia a kanamicina. La cepa *E. coli* LBP FTO (LeanBioPro, Freedom To Operate) se transformó con el plásmido resultante, pJ411_QG31 (Figura 2.2, panel izquierdo).

Para estudiar las proteínas contaminantes del hospedador específico (HCPs, ver más adelante), se desarrolló una cepa nula. Para ello, una secuencia de ADN sin sentido se insertó en el plásmido pJ411 (Figura 2.2, panel derecho) con el que se transformó la misma cepa *E. coli* LBP FTO empleada para la expresión de QG31.

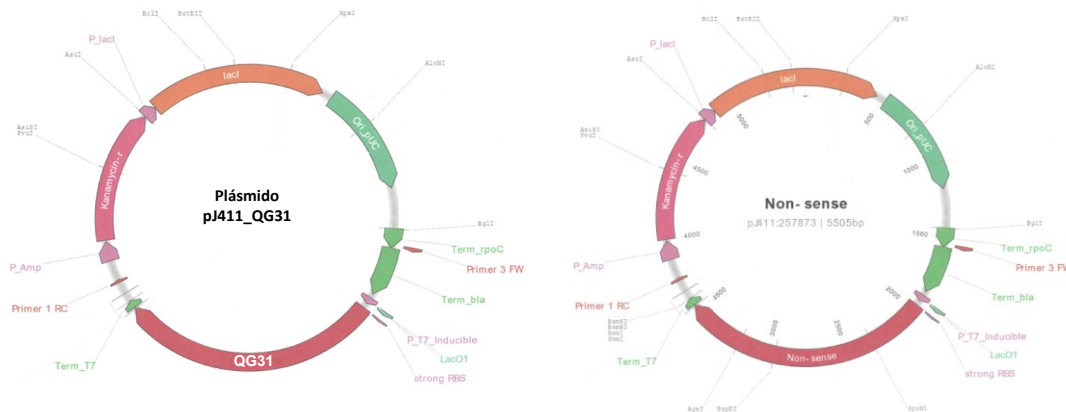


Figura 2.2. Mapa del plásmido pJ411 con la secuencia codificante de QG31 (panel izquierdo) y sin ella (copia “sin sentido”) (panel derecho).

Para generar el RCB (*Research Cell Bank*), la cepa transformada se creció en un medio rico hasta una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 2.5 ± 0.5 UA. El cultivo se centrifugó y las células se resuspendieron a una concentración de 3×10^{10} UFC/mL en medio TB con un 30 % de glicerol y se congelaron a -70 °C.

2.1.2. Producción de biomasa

a) Escala Erlenmeyer

Los primeros estudios de QG31 se realizaron con células BL21(DE3)/pET26b_QG31 en cultivos a pequeña escala en matraz Erlenmeyer crecidos en un medio definido y sintético (denominado MD01) suplementado con 30 µg/mL kanamicina.

La composición del medio MD01 fue:

- Solución de macroelementos (110 mM H_2KPO_4 , 32 mM NaCl, 28 mM $(NH_4)_2SO_4$)
- Solución fuente de carbono (22.5 g/L glucosa)
- Solución fuente de magnesio (2 mM $MgSO_4$)
- Solución fuente de hierro (0.37 mM $FeCl_3$)
- Solución trazas minerales (2.79 mM $CaCl_2$, 0.05 mM $AlCl_3$, 0.88 mM $ZnCl_2$, 0.19 mM $CoCl_2$, 1.76 mM $CuSO_4$, 0.05 mM H_3BO_3 , 0.2 mM $MnSO_4$, 0.03 mM Na_2MoO_4)

La expresión de la proteína QG31 se indujo con IPTG a una concentración final de 0.8 mM y se evaluó la expresión de QG31 a 37 °C y 30 °C, a 2 y a 4 h desde la inducción de la expresión.

La biomasa se recolectó centrifugando a 10 000 xg durante 10 minutos a 4 °C. La biomasa se resuspendió en 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, y se centrifugó una segunda vez a 3 800 xg durante 20 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante y el *pellet* (biomasa) se almacenó a -20 °C.

Para su descongelación, sobre el *pellet* se añadió 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 y se descongeló a temperatura ambiente. Las células se lisaron por ultrasonidos en el sonicador Branson 250 (Branson Ultrasonics) mediante una sonda de 10 mm de diámetro durante 5 minutos en ciclos de 0.5 s. A continuación, el lisado bacteriano se clarificó por centrifugación a 13 000 xg durante 20 min a 5 °C.

b) Escala biorreactor

Para llevar a cabo la sobreexpresión de QG31 a gran escala se empleó un biorreactor Biostat B Plus (Sartorius) controlado por el software MFCS/win.

Las fermentaciones en biorreactor constan de dos fases o etapas (o modos de cultivo):

- Fase discontinua (*batch*) (sin alimentación). Se introduce en el biorreactor la carga total del proceso de cultivo o fermentación y se lleva a cabo el proceso productivo o la fermentación por el tiempo necesario
- Fase semicontinua (*fed-batch*). Consiste en mantener una línea de entrada o alimentación para que el sistema de cultivo tenga un producto (biomasa) con máximo crecimiento (exponencial) aumentando así la productividad.

Durante la primera fase de desarrollo, tras descongelar una alícuota de la cepa BL21(DE3)/pET26b_QG31, se inoculó un matraz Erlenmeyer de 0.5 L de capacidad con 100 mL de medio MD01 (pre-inóculo). El matraz se incubó a 37 °C con una agitación de 250 rpm durante 12 h hasta una densidad óptica a 600 nm de 2.5 UA. A continuación, se inoculó el biorreactor, con 3 L de medio MD01, suplementado con 0.1 mg/mL de kanamicina.

La fermentación se llevó a cabo en las siguientes condiciones:

- Temperatura: 37 °C
- pH: 7.0
- Oxígeno disuelto: 35 %
- Agitación 500-1100 rpm
- Flujo de aire: 3 lpm
- Flujo de oxígeno: 0 - 3 lpm

Durante el proceso el pH se mantuvo a 7.0 ± 0.1 mediante la adición de amoníaco (25 %) o ácido orto-fosfórico (10 % H_3PO_4). Como antiespumante se empleó EX-CELL® Antifoam (Sigma-Aldrich).

La velocidad específica de crecimiento del cultivo, μ , se calculó según la fórmula:

$$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)} = \text{Ln}(\text{DO600}_{\text{final}}/\text{DO600}_{\text{inicial}}) / (t_{\text{final}} - t_{\text{inicial}})$$

donde:

- μ : la velocidad de crecimiento
- Ln DO600: el logaritmo neperiano de la densidad óptica a 600 nm
- t: tiempo

Las condiciones de las fermentaciones durante la segunda fase de desarrollo se explican en el apartado "3. Resultados".

La capacidad de retención de plásmido por la cepa transformada en ausencia de presión selectiva (kanamicina) se analizó de la siguiente manera: a partir de una muestra del cultivo en el biorreactor se hicieron diluciones decimales seriadas en solución salina estéril (por triplicado). Se plaquearon 100 μ L de cada dilución en placas Petri con medio LB-agar y se incubaron durante 24 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se contaron las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL).

De cada réplica de dilución decimal seriada, se picaron 100 colonias y de cada colonia picada se hizo una estría en una placa de LB agar + kanamicina y otra de LB agar. En la misma placa se inocularon la cepa que contenía el plásmido de expresión y la cepa sin el plásmido de expresión como control positivo y negativo, respectivamente.

Tras incubar las placas durante 24 h a 37 °C, se calculó el porcentaje de *retención de plásmido* como la proporción de colonias crecidas en LB agar + kanamicina respecto a las crecidas en LB agar⁹⁶.

2.1.3. Lisis y clarificación (escala biorreactor)

La biomasa procedente de la fermentación, recogida mediante centrifugación, se lisó mediante el disruptor celular TS5/40/AE/GA (Constant Systems Ltd.). Inicialmente el proceso de lisis y clarificación se realizó de la siguiente manera:

- Descongelación de la biomasa durante 16 h a 2-8 °C.
- Resuspensión en tampón 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 hasta una densidad óptica teórica de 100 UA.
- Lisado en el disruptor:
 - o Primer pase a 1 000 bar de presión
 - o Segundo pase a 800 bar de presión
- Clarificado por centrifugación a 13 000 $\times g$ y 5 °C durante 30 min
- Filtración del sobrenadante a través de filtros AP (Millipore) de 2 μm de tamaño medio de poro mediante vacío
- Filtración a través de filtros en profundidad de 0.5 a 0.2 μm de tamaño de poro Opticap XL 150 capsule (Millipore)

El proceso de lisis y clarificación en las fases posteriores de desarrollo se describirá en el capítulo "3. Resultados".

2.2. TÉCNICAS RELACIONADAS CON LA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNA - ETAPA DSP (DOWNSTREAM PROCESS)

La sobreexpresión de una proteína recombinante en cualquier hospedador requiere de su posterior purificación, proceso mediante el cual la molécula de interés se separa de los componentes celulares tales como otras proteínas del hospedador, formas truncadas y/o degradadas, oligómeros, endotoxinas, etc.

El proceso de purificación de QG31 se llevó a cabo mediante cromatografía, y se desarrolló en base a las características físico-químicas de la molécula: carga superficial neta (cromatografía de intercambio iónico), hidrofobicidad (cromatografía de interacción hidrofóbica) y tamaño (cromatografía de exclusión molecular).

La cromatografía es un método físico de separación, utilizada para el aislamiento de compuestos (cromatografía preparativa) o la caracterización de mezclas complejas (cromatografía analítica, que permite identificar y cuantificar los componentes de una mezcla). La cromatografía separa los distintos componentes de una mezcla inicial en base al principio de retención selectiva.

Las etapas de cualquier cromatografía de afinidad (en las que hay unión entre los componentes, en nuestro caso proteínas, de la muestra y la resina cromatográfica) son:

- Equilibrado: acondicionamiento de la columna previa a la aplicación de la muestra
- Aplicación: introducción de la muestra en la columna equilibrada

- Lavado: eliminación de las proteínas no retenidas a la resina (muestra no adsorbida o *flow through*)
- Elución: etapa en la que se separa la muestra adsorbida a la resina de la misma
- Lavado de la columna: eliminación de toda muestra unida a la resina
- Reequilibrado: reacondicionamiento de la columna para un nuevo cromatograma

Las cromatografías analíticas que se llevaron a cabo durante este trabajo se realizaron en un cromatógrafo ÄKTA FPLC Pure (GE Healthcare), y se detallan en el apartado “3. Resultados”.

Las cromatografías preparativas que se llevaron a cabo durante este trabajo se realizaron en un cromatógrafo ÄKTA FPLC Purifier100 (GE Healthcare) y se detallan a continuación. Todos los tampones y muestras empleadas en este apartado se filtraron por filtros con un tamaño medio de poro de 0.45 μm .

2.2.1. Cromatografía de intercambio iónico (IEX)

La cromatografía de intercambio iónico (IEX, *ionic exchange chromatography*) separa las biomoléculas en base a su carga superficial neta. Las resinas de intercambio iónico constan de partículas esféricas en cuya superficie se encuentran covalentemente unidos, mediante un *linker* o espaciador, grupos iónicos cargados negativamente (catiónicos) o positivamente (aniónicos).

Las proteínas, al pH equivalente a su punto isoeléctrico no presentan carga neta y por ello no pueden unirse a una fase sólida cargada. Sin embargo, por encima de su punto isoeléctrico, la proteína tendrá carga negativa y se unirá a una resina cargada positivamente (intercambiador aniónico), mientras que por debajo de su punto isoeléctrico la proteína tendrá carga positiva y se unirá a una resina cargada negativamente (intercambiador catiónico).

Las proteínas se aplican sobre la fase sólida correspondiente en un tampón con el pH adecuado y una reducida fuerza iónica, pues valores elevados de ésta dificultan la unión de moléculas cargadas a resinas de intercambio iónico. Tras la unión de la molécula de interés a la resina, se lleva a cabo un lavado de la muestra no unida, reequilibrando la columna en el tampón inicial. Para eluir la proteína, se incrementa la fuerza iónica (concentración de sal) rompiendo las interacciones de las proteínas con los grupos químicos de la resina. Este aumento puede ser progresivo (consiguiendo liberar y separar a su vez proteínas que se unen a la resina, pero difieren en su afinidad a la misma) o escalonado (en *steps*, liberando a la vez toda la fracción unida).

A lo largo del desarrollo para la obtención del método óptimo de purificación de QG31 se emplearon tanto columnas de intercambio iónico comerciales (GE Healthcare) como columnas empaquetadas manualmente a partir de carcasas vacías y las resinas de interés (GE Healthcare) (Apartado “2.2.3. Empaquetado de columnas (escalado)”). En la Tabla 2.1. se muestran las columnas y resinas utilizadas.

Tabla 2.1. Especificaciones de las columnas de intercambio iónico empleadas (GE Healthcare).

| Columna | Tipo de intercambiador aniónico | Ligando | Tamaño de partícula (μm) | Volumen de columna (mL) | Altura de la columna (cm) | Diametro interno (cm) | Flujo máximo (cm/h) |
|-------------------------------------|---------------------------------|---|---------------------------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------|
| HiTrap Q HP | Fuerte | $-\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ | 34 | 5.0 | 2.50 | 1.60 | <600 |
| HiScreen Capto DEAE | Débil | $-\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ | 90 | 4.7 | 10.00 | 0.77 | <700 |
| HiScreen Q sepharose FF | Fuerte | $-\text{N}^+(\text{CH}_3)$ | 90 | 4.7 | 10.00 | 0.77 | <450 |
| Resina CaptoDEAE en carcasa XK26/20 | Débil | $-\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ | 90 | 53.0 | 10.00 | 2.60 | <700 |




En el apartado Resultados se detallarán las condiciones (tampones y flujos) en las que se emplearon dichas resinas y columnas. El máximo flujo y presión son especificaciones técnicas fijadas para cada columna.

2.2.2. Cromatografía de interacción hidrofóbica

La cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, *Hydrophobic Interaction Chromatography*) separa las proteínas en base al grado de hidrofobicidad. Las resinas de interacción hidrofóbica constan de partículas esféricas en cuya superficie se encuentran covalentemente unidos, mediante un *linker* o espaciador, grupos hidrofóbicos. La mayor parte de las proteínas se componen de grupos cargados en su superficie y núcleos hidrofóbicos. En condiciones de alta fuerza iónica se favorecen las interacciones hidrofóbicas entre las proteínas y la resina hidrofóbica. De modo inverso a lo que sucede en las cromatografías de intercambio iónico, para eluir las proteínas unidas, se disminuye de modo gradual dicha fuerza iónica reduciendo la concentración de la sal, lo que conlleva la separación paulatina de las diferentes proteínas según su grado de hidrofobicidad.

A lo largo del desarrollo para la obtención del método óptimo de purificación de QG31 se emplearon tanto columnas de interacción hidrofóbica comerciales (GE Healthcare) como columnas empaquetadas manualmente (GE Healthcare) (Apartado “2.2.3. Empaquetado de columnas (escalado)”). En la Tabla 2.2. se muestran las columnas y resinas utilizadas.

Tabla 2.2. Especificaciones de las columnas de interacción hidrofóbica empleadas (GE Healthcare).

| Columna | Ligando | Volumen de columna (mL) | Altura de la columna (cm) | Diametro interno (cm) | Tamaño de partícula (µm) | Flujo máximo (cm/h) |
|---|---|-------------------------|---------------------------|-----------------------|--------------------------|---------------------|
| HiTrap Phenyl (HP) | Fenil -O-  | 5.0 | 2.5 | 1.60 | 34 | <150 |
| HiScreen Capto Phenyl | Fenil | 4.7 | 10.0 | 0.77 | 40 | <220 |
| HiScreen Phenyl Sepharose (HP) | Fenil -O-  | 4.7 | 10.0 | 0.77 | 34 | < 150 |
| HiScreen Capto Butyl | Butil | 4.7 | 10.0 | 0.77 | 75 | < 600 |
| HiScreen Octyl sepharose Fast Flow | Octil | 4.7 | 10.0 | 0.77 | 90 | < 240 |
| Resina Phenyl Sepahrose HP en carcasa XK16/20 | Fenil -O-  | 20.1 | 10.0 | 1.60 | 34 | < 150 |

En el apartado Resultados se detallarán las condiciones (tampones y flujos) a las que se emplearon dichas resinas y columnas.

2.2.3. Empaquetado de columnas (Escalado)

El escalado de las columnas de cromatografía se llevó a cabo empaquetando resina comercial en carcasas XK26/20 y X16/60 para las cromatografías de intercambio iónico e interacción hidrofóbica respectivamente. Una vez añadido el volumen necesario de resina en cada carcasa y empaquetada ajustando el cierre de la columna se llevó a cabo un test de empaquetado para analizar la eficiencia del mismo. Este test consistió en la aplicación de un flujo lineal de 150 cm/h siendo la fase móvil 0.4 M NaCl en agua y la inyección 1 mL de 0.8 M NaCl en agua (para la resina de interacción hidrofóbica) y 0.2 mL de 2 M NaCl en agua purificada (para la de interacción hidrofóbica).

Para cada columna empaquetada, se analizó la asimetría del pico (Figura 2.3) al 10 % de la altura del pico obtenido en el test de empaquetado, cuyo resultado se muestra en el apartado correspondiente del capítulo “3. Resultados”.

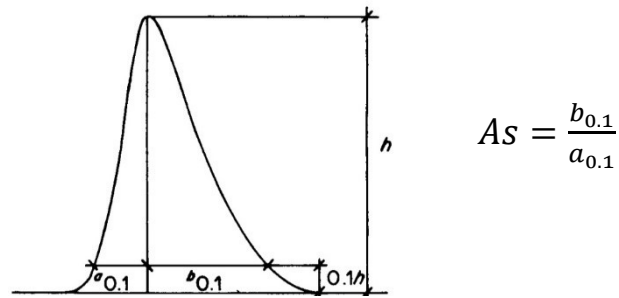


Figura 2.3. Asimetría de un pico cromatográfico. Ecuación para el cálculo de la asimetría.

2.2.4. Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular (SEC, *Size Exclusion Chromatography*) separa las moléculas en base a su tamaño (radio hidrodinámico), siendo la única cromatografía en la que la molécula de interés no se une a la resina. La superficie de las partículas esféricas que componen las diferentes resinas SEC es inerte y hueca, con múltiples conductos internos que permiten la separación de moléculas que se diferencian por su radio hidrodinámico. Cada resina SEC separa un diferente rango de radio hidrodinámico. Un subtipo de cromatografía SEC es la cromatografía de desalado (DSC), que separa únicamente dos fases: moléculas pequeñas como sales de moléculas superiores a ≈ 5 kDa. En el proceso de obtención de QG31 se empleó la columna de DSC HiPrep 26/10 Desalting (GE Healthcare) como último paso en la obtención del producto terminado.

2.2.5. Placas Predictor

Las placas Predictor (GE Healthcare) son placas de 96 pocillos que contienen resina cromatográfica en la parte inferior de cada pocillo. Dos filtros hidrofílicos se encuentran en las posiciones inmediatamente superior e inferior a la resina, actuando de tapón para que no se pierda la resina, pero permitiendo que el flujo líquido la atraviese. Cada pocillo funciona teóricamente como una columna cromatográfica individual, lo que permite analizar simultáneamente multitud de condiciones en un único soporte, reduciendo con ello el uso de material y el tiempo de experimentación.

En la fase de desarrollo de la purificación de QG31 se emplearon los siguientes kits:

- Placas Predictor CIEX (GE Healthcare)
- Placas Predictor AIEX (GE Healthcare)

El esquema de trabajo con las placas Predictor se muestra en la Figura 2.4.

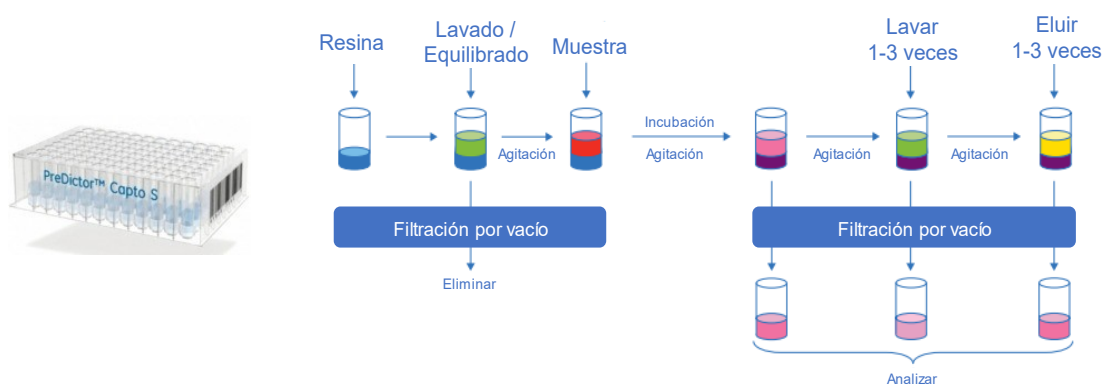


Figura 2.4. Esquema de trabajo con las placas Predictor. Modificado de GE Healthcare.

2.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

El desarrollo de métodos analíticos es la primera fase en el desarrollo de cualquier producto farmacéutico. En el presente trabajo, en ocasiones se partió de métodos ya parcialmente establecidos, mientras que otras metodologías se debieron desarrollar en su totalidad.

2.3.1. SDS-PAGE y tinción de coomassie

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, *Polyacrylamide gel electrophoresis*) consiste en separar las proteínas (en condiciones desnaturizantes por la adición de SDS) mediante la aplicación de un campo eléctrico, que provoca su movilidad electroforética a través de una red de acrilamida. Tras su migración se pueden teñir todas las proteínas que han migrado o identificar proteínas concretas mediante anticuerpos (ver apartado 2.3.2. Western blot).

La movilidad electroforética de una proteína depende de la longitud de la cadena polipeptídica, carga y modificaciones postraduccionales, así como otros factores). El detergente SDS desnatura las proteínas y las recubre, confiriéndoles una carga negativa teóricamente proporcional a su masa, y estas migran hacia el ánodo tras aplicar una corriente eléctrica. Como agente reductor puede emplearse (o no) el β -mercaptoetanol (β -ME), según si se desea romper o no los puentes disulfuro. El β -ME rompe los puentes disulfuro de las proteínas, de modo que en caso de proteínas que oligomerizan, al emplear β -ME en el gel se visualizarían las unidades simples, mientras que en geles sin β -ME se vería el tamaño del oligómero (en caso de que los oligómeros estén unidos por puentes disulfuro).

Se siguió el método de desarrollado por Laemmli aplicando tanto las modificaciones sugeridas por los fabricantes del sistema de electroforesis utilizado MINI-PROTEAN® (Bio-Rad), como las derivadas del desarrollo y optimización del método durante el transcurso de este trabajo.

Para cubrir diferentes rangos de pesos moleculares, se emplearon geles del 12.5 % de acrilamida y del 8 % de acrilamida, utilizando en cada caso marcadores de pesos moleculares diferentes. Para los geles al 12.5 % de acrilamida se emplearon los marcadores “Low Molecular Weight Calibration kit for SDS Electrophoresis” (GE Healthcare), y para los geles al 8 % de acrilamida se emplearon los marcadores “High Molecular Weight Calibration kit for SDS Electrophoresis” (GE Healthcare) (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Composición de los marcadores de peso molecular para SDS-PAGE. Tabla izquierda: “Low Molecular Weight Calibration kit for SDS Electrophoresis” (GE Healthcare). Tabla derecha: “High Molecular Weight Calibration kit for SDS Electrophoresis” (GE Healthcare).

| Proteína | Peso molecular (kDa) | Proteína | Peso molecular (kDa) |
|-------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------|
| Fosforilasa b | 97 | Miosina | 220 |
| Seroalbúmina bovina | 66 | α - macroglobulina | 170 |
| Ovoalbúmina | 45 | β -galactosidasa | 116 |
| Anhidrasa carbónica | 30 | Transferrina | 76 |
| Inhibidor de tripsina | 20.1 | Glutamato deshidrogenasa | 53 |
| α - lactalbúmina | 14.4 | | |

Tras su migración a 150 V durante 60-70 min, los geles se tiñeron durante 16 h en agitación con Coomassie [0.1 % (p/v) Coomassie Brilliant Blue R (Sigma-Aldrich) en 40 % (v/v) metanol, 10 % (v/v) ácido acético] con incubación en agitación. Transcurrido ese tiempo, los geles se destiñeron mediante 3 tandas de 20 min en agitación en la disolución: 40 % metanol, 10 % ácido acético. La captura de las imágenes de los geles se realizó en el equipo G:BOX Chemi XL1.4

(Syngene) y el análisis de densitometría de las bandas y el peso molecular de las mismas se realizó con el software Genetools (Syngene).

2.3.2. Western blot

El Western blot, o *immunoblot*, es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada. En primer lugar, mediante una electroforesis en gel (ver apartado anterior) se separan las proteínas. El gel de poliacrilamida se dispone encima de una membrana adsorbente, típicamente de nitrocelulosa o de fluoruro de polivinilideno (PVDF), a la cual se transfieren mediante la aplicación de un segundo campo eléctrico. Posteriormente, la membrana con las proteínas transferidas es incubada con anticuerpos específicos que se unen a la(s) proteína(s) de interés, y mediante una actividad enzimática (frecuentemente asociada a fluorescencia) permite detectar específicamente la proteína de interés donde ha producido la unión antígeno-anticuerpo.

Tras la electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) (como en el caso de SDS-PAGE y *Coomassie* se emplearon geles de 12.5 % de acrilamida y de 8 % de acrilamida), las proteínas se transfirieron a membranas PVDF Immun-Blot (Bio-Rad) en equipos "Trans-Blot Turbo Transfer System" (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon con PBS + Tween20 0.05 % + Leche 5 % durante 1 h a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron con el anticuerpo específico de captura para la detección durante 16 h a 4 °C en agitación. Tras lavar las membranas durante 1 h a temperatura ambiente con PBS + Tween 0.05 %, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario (conjugado a peroxidasa) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Para la detección se empleó el revelador ECL Prime (GE Healthcare) (mediante incubación de 5 min a temperatura ambiente). La captura y análisis de las imágenes de los geles se realizó como en la técnica anterior de SDS-PAGE mediante el equipo G:BOX Chemi XL1.4 y el software Genetools (Syngene).

Se testaron los siguientes anticuerpos de captura:

- Anticuerpo primario monoclonal Anti-Phl p 5 10B1 (purificado a partir del sobrenadante de hibridoma (ratón) mediante cromatografía de afinidad a proteína G)
- Anticuerpo policlonal Anti-Phl p 5 (obtenido en conejos)
- Anticuerpo policlonal Anti-Lol p 1 (obtenido en conejos)
- Anticuerpo policlonal Anti-QG31 (obtenido en conejos mediante inyección de QG31 purificada durante el POC, ver más adelante)

Según el anticuerpo de captura utilizado, se emplearon los siguientes anticuerpos secundarios.

- Anti-IgG conejo-peroxidasa (Dako)
- Anti-IgG ratón-peroxidasa (Sigma-Aldrich)

2.3.3. Cromatografía analítica

Para caracterizar QG31 se llevaron a cabo dos tipos de cromatografías analíticas en el cromatógrafo ÄKTA Pure 25 (GE Healthcare).

Cromatografía de exclusión molecular (SEC)

Como ya se ha comentado anteriormente, el tamizado o exclusión molecular consiste en la separación por tamaño de las proteínas al atravesar una resina cromatográfica con esferas porosas. Las moléculas más pequeñas difunden más por las oquedades interiores de las esferas y eluyen de la columna más tarde que las moléculas grandes que no penetran en dichas oquedades.

Para analizar el estado oligomérico de QG31 se empleó la columna Agilent Bio SEC-5 5 μm , 300 \AA , 7.8 x 300 mm (Agilent) en el equipo ÄKTA Pure 25 (GE Healthcare). Inmediatamente antes de su inyección, las muestras se filtraron con filtros Captiva Syringe (0.2 μm , 4 mm, PES; Agilent).

Como marcadores de peso molecular se empleó "BEH200 SEC Protein Standard Mix" (Waters) que contenía las proteínas recogidas en la Tabla 2.4.

Tabla 2.4. Composición de los marcadores de peso molecular "BEH200 SEC Protein Standard Mix" para cromatografía de exclusión molecular (SEC).

| Molécula | Peso molecular (kDa) |
|---------------------------|----------------------|
| Tiroglobulina | 669 |
| IgG | 150 |
| BSA (seroalbúmina bovina) | 66 |
| Mioglobina | 17 |
| Uracilo | 0.11 |

Cada vial de marcadores se resuspendió en 500 μL de 150 mM fosfato sódico, pH 7. Se diluyó $\frac{1}{4}$ con el buffer de la fase móvil y se filtró por filtros Captiva Syringe (0.2 μm , 4 mm, PES; Agilent) antes de aplicar en la columna.

Cromatografía de fase reversa

La cromatografía por fase reversa se basa en la separación de moléculas por polaridad. La fase estacionaria es una matriz apolar y como fase móvil se emplean mezclas de solventes polares como agua o acetonitrilo. Las moléculas (proteínas en este trabajo) se unen a la fase estacionaria mediante interacciones hidrofóbicas y, de modo análogo a la cromatografía HIC, se disminuye progresivamente la polaridad del solvente (sustituyendo el agua de la fase móvil por un solvente orgánico como el acetonitrilo), liberando las proteínas de un modo gradual en función de su afinidad por la fase estacionaria.

En las cromatografías de fase reversa, se empleó acetonitrilo calidad HPLC (Scharlau) y ácido trifluoroacético (Merck). Las muestras se filtraron mediante filtros Captiva Syringe (0.2 μm , 4 mm, PES; Agilent) antes de ser inyectadas en la columna de fase reversa Agilent ZORBAX 300SB-C18 (4.6x250mm, 5 μm ; Agilent) protegida con una pre-columna HPLC 300SB-C18 (Agilent) equilibrada en 0.1 % de trifluoroacético en agua ultrapurificada. La fracción unida se eluyó en gradiente con 0.1 % de trifluoroacético en acetonitrilo.

2.3.4. Cuantificación de proteína total por Bradford

Para determinar la concentración de proteína total en las muestras, se empleó la técnica de Bradford en microplaca, basada en el método diseñado por Bradford⁹⁷ y fundamentado en el desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción que sufre el Azul de Coomassie G-250 de 465 a 595 nm cuando se une a las proteínas. El colorante interacciona fundamentalmente con aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente residuos de arginina, aunque también con residuos de histidina, lisina, tirosina, triptófano y fenilalanina.

Como referencia para la recta patrón se empleó la seroalbúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich).

En placas de 96 pocillos de baja afinidad (Greiner Bio One), en cada pocillo se añadieron 50 μL de muestra, patrón o blanco, tras lo cual se añadieron 200 μL del colorante [reactivo Bradford (Bio-Rad Protein assay) diluido $\frac{1}{4}$]. Tras una incubación a temperatura ambiente de 5 min se cuantificó la absorbancia a 595 nm en el lector de microplacas Sunrise (Tecan) con el software *Magellan*.

2.3.5. Cuantificación de QG31 por el método de ELISA doble fase

Este inmunoensayo, que permite cuantificar de modo específico proteínas individuales, se basa en la fijación en placas de ELISA (Greiner Bio One) de un anticuerpo de captura específico para la proteína a cuantificar (Figura 2.5). A continuación, los pocillos son incubados con diluciones del alérgeno de referencia o de la muestra. Seguidamente se añade un segundo anticuerpo marcado con biotina que se unirá, del mismo modo que el primer anticuerpo utilizado, a la proteína inmovilizada. Finalmente, tras la incubación con estreptavidina conjugada a peroxidasa que se une específicamente a la biotina (unida al segundo anticuerpo), y posterior revelado con el sustrato, se construye una curva estándar que relaciona absorbancia y concentración de la proteína de interés en las muestras.

Las placas se tapizaron con el anticuerpo de captura (anticuerpo primario monoclonal Anti-Phl p 5 10B1, disuelto en PBS) durante 16 h a 4 °C. A continuación, se añadieron las muestras, el patrón y los blancos y se incubó durante 1 h a 37 °C. Tras lavar las placas, se incubaron con anticuerpo policlonal contra Phl p 5 marcado con biotina (Sigma-Aldrich) durante 1 h a 37 °C, y tras lavar de nuevo, se incubaron con estreptavidina conjugada a peroxidasa (Sigma-Aldrich) durante 1 h a 37 °C. Para el revelado se empleó SIGMAFAST™ OPD (Sigma-Aldrich), y la reacción se paró con ácido sulfúrico 3 M. La lectura de la absorbancia a 492 nm se realizó en el lector de microplacas Sunrise (Tecan) con el software Magellan.

Las muestras, patrones y blancos, así como el anticuerpo biotinado y la estreptavidina, se prepararon en PBS-T-B (PBS, Tween 0.05 %, BSA 1 %). Los lavados se realizaron con PBS-Tween 0.05 %.

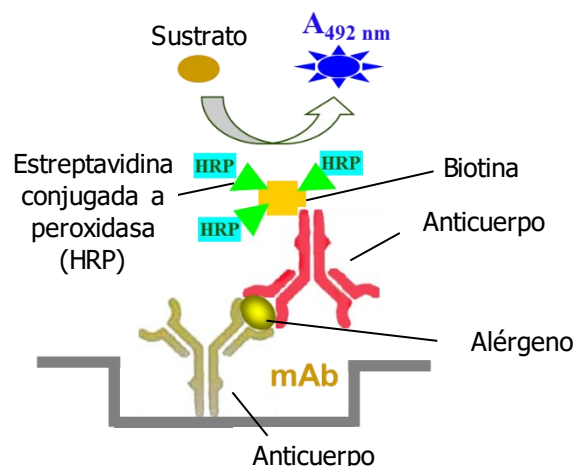


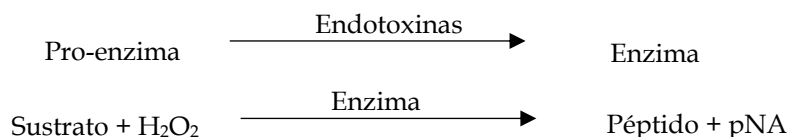
Figura 2.5. Esquema del ensayo de ELISA doble fase.

2.3.6. Cuantificación de endotoxinas (LAL)

Las endotoxinas son un componente de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Están compuestas por lípidos y polisacáridos y son estimulantes del sistema inmune, con un potente efecto tóxico, por lo que el uso de productos farmacéuticos basados en proteínas recombinantes exige su cuantificación y control por debajo de unos límites. El límite admitido en la Farmacopea Europea es de 700 EU/dosis, pero para cada producto farmacéutico se debe definir el mínimo nivel de endotoxinas que debe tener.

La técnica de cuantificación de endotoxinas se basa en un lisado de amebocitos circulantes del cangrejo herradura "Limulus Amebocyte Lysate" (LAL) y un sustrato sintético que produce color para detectar cromogénicamente la concentración de endotoxinas. Las endotoxinas de bacterias Gram negativas catalizan la activación de una pro-enzima en el lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL). La velocidad de activación viene determinada por la concentración de endotoxina

presente, siendo lineal en rangos concretos. La enzima activa cataliza el corte del sustrato incoloro Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA liberando, en una reacción dependiente de la temperatura, *p*-nitroanilina (pNA), compuesto de color amarillo que se cuantifica a 405 nm tras haber parado la reacción.



La concentración de endotoxinas en las muestras problema se calcula a partir de los valores de absorbancia de soluciones que contienen concentraciones conocidas de endotoxinas.

El kit empleado fue “Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL-1000, 120 Test kit” (Lonza), que incluye un patrón de endotoxinas para preparar la recta patrón, el lisado de *Limulus Amebocyte* y el sustrato. La técnica exige emplear todo el material y disoluciones libres de pirógenos, por lo que se utilizaron fungibles específicos para dicho uso, y todo el material empleado en el ensayo o en la generación de los tampones (vasos de precipitados, matraces, espátulas, moscas) se despirogenizó a 160 °C durante 6 h o mediante una incubación de al menos 16 h en NaOH 0.5 M.

En placas de 96 pocillos (apirógenas, LONZA) se añadieron, por pocillo, 50 µL de muestra, patrón o blanco, más 50 µL del lisado LAL. La placa se incubó a 37 °C (en termobloque) durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 100 µL del sustrato (pre-calentado a 37 °C) y se incubó durante 6 min. La reacción se paró con SDS 10 % y la absorbancia a 405 nm se leyó en el lector de microplacas Sunrise (Tecan) con el software *Magellan*.

2.3.7. Cuantificación de HCPs mediante ELISA

Las proteínas residuales de la célula hospedadora (HCPs, Host Cell Proteins) constituyen impurezas de proceso derivadas del organismo hospedador (en nuestro caso *E. coli*) empleado para la producción de la proteína recombinante. Se debe reducir su proporción al mínimo posible para evitar sus posibles efectos adversos como la inmunogenicidad⁹⁸.

Para la cuantificación de HCP se empleó el kit “Immunoenzymetric Assay kit for the measurement of *E. coli* Host Cell Proteins” (Cygnus Technologies). El kit está desarrollado para determinar la presencia de HCP de *E. coli* en productos producidos en *E. coli*⁹⁹. El método consiste en incubar en los pocillos de la placa los estándares (suministrados en el kit), muestras y blancos junto con el anticuerpo anti-*E. coli*:HRP durante 90 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar (con Wash Buffer 1x) e incubar con el sustrato TMB (tetramethyl benzidine) se añade la solución de parada y se lee la absorbancia a 450 nm en el lector de placas Sunrise (Tecan) con el software *Magellan*.

Los resultados de la recta patrón se ajustan a la ecuación:

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b}$$

donde:

- *a* es el mínimo valor que se puede obtener
- *b* es la pendiente de la curva, pendiente de Hill
- *c* es el punto de inflexión (punto medio de la curva entre los valores *a* y *d*)
- *d* es el máximo valor que se puede obtener
- *y* es la absorbancia a 450 nm
- *x* es la concentración de HCPs.

2.3.8. Dicroísmo circular

El dicroísmo circular es una técnica espectroscópica de absorción que provee información acerca de la estructura (normalmente secundaria pero también sobre la estructura terciaria) de macromoléculas biológicas. Esta técnica se basa en la absorción diferencial de luz circularmente polarizada por centros quirales (los carbonos α del enlace peptídico), pudiéndose determinar, a partir del espectro de la muestra problema, la proporción de distintos tipos de estructura secundaria (hélice α , hebra β , lazos y giros) para un polipéptido¹⁰⁰. Típicamente, la estructura en α -hélice de las proteínas muestran dos mínimos en su espectro de CD, uno a 222 nm y otro a 208 nm, mientras que las láminas β adquieren un solo mínimo a 216 nm. Por otro lado, la conformación desordenada (*random coil*) muestra un mínimo a 200 nm (Figura 2.6).

Las medidas de dicroísmo circular se realizaron en el Instituto Biofísica (Centro Vasco de Biofísica, EHU/UPV-CSIC) en un espectropolarímetro J-810-150S (Jasco), controlado térmicamente por un sistema Peltier PTC-423S acoplado a un sistema de circulación *Circulator C-400*.

Los espectros de dicroísmo se realizaron con QG31 disuelta en solución salina a una concentración de 9 μ M en cubetas de cuarzo SUPRASIL QS de 0.1 cm de paso óptico (Hellma) a 20 °C, en el rango 190-250 nm, con una sensibilidad de 100 mdeg, una apertura de banda de 2 nm, un tiempo de respuesta de 4 seg y una velocidad de barrido de 100 nm/min. Cada espectro se obtuvo al promediar 5 barridos.

Los barridos de temperatura se realizaron en el rango 10-90 °C a una longitud de onda fija de 222 nm, con tiempo de respuesta de 4 seg y una velocidad de calentamiento de 1 °C/min.

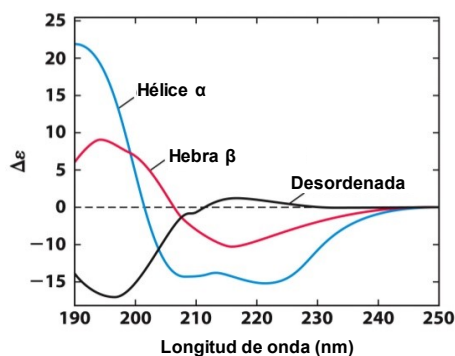


Figura 2.6. Espectro de dicroísmo circular característicos una estructura en α hélice (en azul), lámina β (en rojo) y desordenada (*random coil*) (en negro). Tomado de *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6^a ed.

2.3.9. Inmunogenicidad

La obtención de QG31 durante la prueba de concepto (ver apartado “3.1. Prueba de Concepto (PoC)”) permitió la generación de anticuerpos policlonales contra la proteína QG31 mediante la inmunización de dos conejos con dicha proteína QG31 purificada (inmunización realizada en ProteoGenix).

La reactividad de los sueros se comprobó inmovilizando en placa QG31 (100 ng por pocillo, 2 h a 37 °C) y tras bloquear con seroalbúmina bovina (BSA) (PBS-Tween 0.05 %-BSA 1 %, 1 h a 37 °C), la placa se incubó con diluciones seriadas de los sueros de conejo comenzando con dilución 1/200 (16 h a 4 °C). Posteriormente, tras lavar la placa con PBS-Tween 0.05 % se incubó con anticuerpos anti-IgG de conejo unidos a peroxidasa (Dako) (1.5 h a 37 °C) y se reveló (tras lavar) con SIGMAFAST™ OPD (Sigma-Aldrich) (30 min a temperatura ambiente). La reacción se paró con ácido sulfúrico 3 M. La lectura de la absorbancia a 492 nm se realizó en el lector de microplacas Sunrise (Tecan) con el software *Magellan*.

El ensayo de producción de IgG bloqueantes se llevó a cabo mediante un ensayo de ELISA inhibición de la unión de IgE de pacientes de gramíneas a “Phl p 1 + Phl p 5” por IgG de los sueros de conejos inducidos por QG31. En este ensayo, tras inmovilizar en placa una mezcla de “Phl p 1 + Phl p 5” (50 ng de cada proteína) (durante 2 h a 37 °C) y bloquear con seroalbúmina bovina (PBS-Tween 0.05 %-BSA 1 %, 1h a 37 °C), la placa se incubó con diluciones seriadas de los sueros anti-QG31 de conejo (comenzando en 1/10) y una dilución fija (1/50) de pool de sueros de pacientes alérgicos a gramíneas (16 h a 4 °C). Tras lavar la placa con PBS-Tween 0.05 %, se incubó con anticuerpos (de ratón) anti-IgE humana unidos a peroxidasa (Southern Biotech) (1.5 h a 37 °C) y se reveló con SIGMAFAST™ OPD (Sigma-Aldrich) (30 min a temperatura ambiente), parándose la reacción con ácido sulfúrico 3 M. La lectura de la absorbancia a 492 nm se realizó en el lector de microplacas Sunrise (Tecan) con el software *Magellan*.

2.3.10. Actividad alérgica

La medida de la actividad alérgica o unión a IgE se realizó mediante un ensayo de ELISA-inhibición. En esta técnica, la unión de los anticuerpos IgE, procedentes de pacientes alérgicos al polen de *Phleum*, es inhibida por la proteína en estudio. Cuantos más epítomos de unión a IgE tenga dicha proteína, mayor será la inhibición producida.

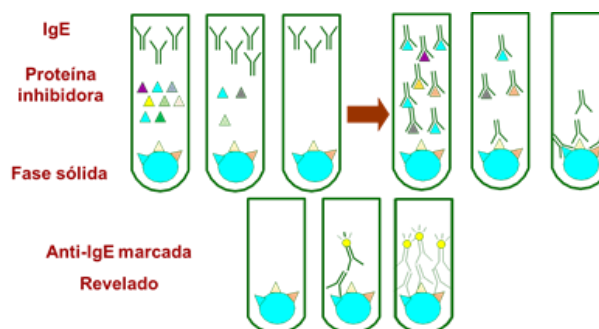


Figura 2.7. Esquema del ensayo de ELISA-inhibición con anticuerpos humanos IgE.

En los ensayos de actividad alérgica, la placa se tapizó con 300 ng de extracto de *Phleum*. Tras incubar 2 h a 37 °C, la placa se bloqueó con PBS-Tween 0.05 %-BSA 1 % durante 1 h a 37 °C. A continuación, la placa se incubó con diferentes concentraciones del competidor (mezcla equimolar de “Phl p 1 + Phl p 5” o QG31) y una mezcla de sueros de pacientes sensibilizados. Tras incubar durante 16 h a 4 °C, la placa se lavó (PBS-Tween 0.05 %) e incubó con anticuerpos de ratón anti-IgE humana unidos a peroxidasa (Southern Biotech) (1 h a 37 °C). Para el revelado se empleó SIGMAFAST™ OPD (Sigma-Aldrich) (30 min a temperatura ambiente), y la reacción se paró con ácido sulfúrico 3M. La lectura de la absorbancia a 492 nm se realizó en el lector de microplacas Sunrise (Tecan) con el software *Magellan*.

2.3.11. Reactividad IgE

Para analizar la reactividad IgE de QG31 en sueros de pacientes, se inmovilizó en placa una mezcla de “Phl p 1 + Phl p 5” (50 ng de cada proteína) o QG31 (100 ng) (2 h a 37 °C) y, tras un paso de bloqueo con seroalbúmina bovina (PBS-Tween 0.05 %-BSA 1 %, 1 h a 37 °C), se incubó con los sueros individuales de pacientes alérgicos a gramíneas (16 h a 4 °C). Tras lavar (PBS-Tween 0.05 %), se reveló con anticuerpos (de ratón) anti-IgE humana unidos a peroxidasa (Southern Biotech) (1 h a 37 °C) y SIGMAFAST™ OPD (Sigma-Aldrich) (30 min a temperatura ambiente), parándose la reacción con ácido sulfúrico 3M. La lectura de la absorbancia a 492 nm se realizó en el lector de microplacas Sunrise (Tecan) con el software *Magellan*.

2.4. CUALIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS (DEFINICIÓN DE TÉRMINOS)

A continuación, se resumirán algunas definiciones que ayudarán a entender posteriormente el desarrollo realizado para las diversas técnicas analíticas durante este trabajo.

Validación de un método analítico

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (USP 31–NF 26, Validación de métodos farmacopéicos).

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es apto para el propósito indicado (ICH Guideline Q2A – Text on Validation of Analytical Procedures).

Especificidad/Selectividad

La especificidad es la capacidad de un procedimiento analítico de analizar inequívocamente el analito en presencia de otros componentes que se espera estén presentes en la muestra. Estos componentes incluyen impurezas, degradaciones, componentes de la matriz (como son los tampones, en cuyo caso se definiría como *selectividad*), etc.

La selectividad se definiría como la capacidad del procedimiento de detectar simultánea o separadamente sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra.

Exactitud

Determinar la exactitud de un procedimiento analítico consiste en expresar la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

Se lleva a cabo utilizando un patrón de pureza conocida o, comparando los resultados del método con aquellos de otro bien caracterizado, cuya exactitud esté definida o, añadiendo cantidades del analito a una mezcla sintética del producto.

Precisión

Determinar la precisión de un procedimiento analítico consiste en determinar el grado de concordancia (grado de dispersión) entre una serie de medidas de tomas múltiples a partir de una misma muestra homogénea en las condiciones prescritas.

La precisión se suele expresar como la desviación estándar o el coeficiente de variación de una serie de medidas.

La precisión se puede considerar a diferentes niveles, uno de ellos la *repetibilidad* que expresa la precisión en las mismas condiciones, sobre el mismo analito, con el mismo método, con el mismo operador, utilizando el mismo instrumento de medida y durante un corto intervalo de tiempo. Este término también se denomina *precisión intra-ensayo*.

Otro nivel en el que se puede considerar la precisión es la *reproducibilidad*, que en este trabajo no se ha considerado ya que se utilizaría durante la validación de la técnica que aquí no hemos considerado. La reproducibilidad es el grado de congruencia de los resultados obtenidos del análisis de las mismas muestras bajo una variedad de condiciones (diferentes laboratorios, diferentes lotes de reactivos, diferentes temperaturas de ensayo, diferentes analistas, diferentes días, etc.).

Límite de detección

El límite de detección de un procedimiento analítico es la menor cantidad de analito de una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto.

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación de un procedimiento analítico es la menor cantidad de analito de muestra que puede ser cuantificado con precisión y exactitud aceptables.

Es característico de los ensayos cuantitativos para compuestos de bajos niveles en matrices de muestras, tales como impurezas y productos de degradación.

Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico es su habilidad para producir resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en muestras dentro de un rango dado.

Rango

El rango de un procedimiento analítico es el intervalo entre las cantidades inferior y superior del analito (incluyendo éstas), que han demostrado pueden ser determinados con un apropiado nivel de precisión, exactitud y linealidad.

Resolución (aplicado a cromatografía)

La resolución indica la capacidad de una columna para separar los picos de interés. Permite conocer si se ha conseguido la separación en la línea de base o no.

Según *European Pharmacopoeia*, la resolución de dos picos cromatográficos (Figura 2.8) se puede calcular mediante la fórmula:

$$R_s = \frac{1.18(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

donde:

- t_{R1} , t_{R2} son los tiempos de retención de los picos
- w_{h1} , w_{h2} es la anchura de los picos a mitad de la altura

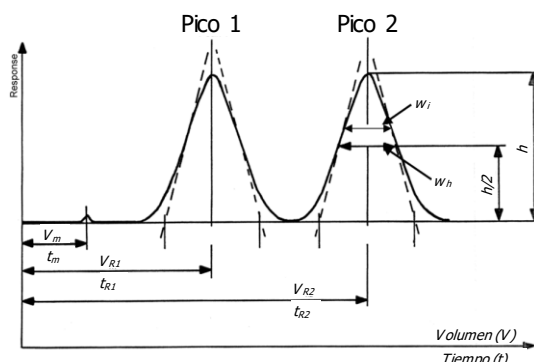


Figura 2.8. Resolución de los picos de cromatografía (*European Pharmacopoeia*).

Se considera que un valor igual o superior a 1.5 se corresponde con una separación en línea de base y garantiza unos resultados cuantitativos de precisión máxima.

3

RESULTADOS

3.2. DESARROLLO Y CUALIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

En el proceso de producción de cualquier producto farmacéutico es imprescindible haber desarrollado previamente técnicas que sean capaces de producir resultados reproducibles adecuados para el propósito de cada técnica. El desarrollo analítico es, por tanto, anterior al desarrollo del proceso, para realizar los controles de proceso (IPC, *In Process Control*) y las pruebas en proceso (IPT, *In Process Tests*) requeridos, y permite evaluar para cada técnica el rango de condiciones experimentales en las que cumple estos requisitos.

En la etapa de producción pre-GMP (GMP: *Good Manufacturing Practice*, Buenas Normas de Fabricación), no es necesaria una validación de las técnicas analíticas como se exige en producción GMP, pero sí es imprescindible conocer los límites y fiabilidad de las técnicas empleadas. Este estudio de la capacidad de las técnicas de producir resultados fiables para los controles en proceso es lo que hemos denominado "cualificación de las técnicas analíticas". Esta cualificación es menos exigente que una validación, en el sentido de que se elimina la realización por parte de diferentes analistas, en diferentes equipos y en diferentes días (realizándose únicamente por un analista en un solo equipo).

Posteriormente, en producción GMP, una vez establecido el proceso de producción, el desarrollo analítico es clave para caracterizar la calidad, seguridad y eficacia del producto obtenido. En esta etapa las técnicas sí deben estar correctamente validadas (ICH Q2 (R1), *Validation of analytical procedure*, Agencia Europea del medicamento).

Para el caso concreto de nuestra molécula QG31, se definieron los atributos de calidad del producto, que establecieron qué técnicas eran las adecuadas (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Cualificación de las técnicas analíticas para definir los atributos de calidad del producto QG31. LD: Límite de Detección. LC: Límite de Cuantificación. "√": parámetros estudiados. "-": parámetros no estudiados.

| MÉTODO ANALÍTICO | PARÁMETRO DE ESPECIFICACIÓN | ATRIBUTO DE CALIDAD | PARÁMETROS DE CUALIFICACIÓN DE LA TÉCNICA | | | | | | |
|-------------------------------------|--------------------------------|--|---|----|------------|--------------|-----------|-----------|--------------|
| | | | LD | LC | Linealidad | Rango lineal | Precisión | Exactitud | Selectividad |
| SDS-PAGE | IDENTIDAD | Estructura primaria (peso molecular) | √ | √ | - | - | √ | - | √ |
| | PUREZA / IMPUREZAS DE PRODUCTO | Variantes de alto peso molecular | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| | | Variantes de bajo peso molecular | | | | | | | |
| WESTERN BLOT | IDENTIDAD | Identidad inmunológica (peso molecular) | √ | - | - | - | √ | - | √ |
| | PUREZA / IMPUREZAS DE PRODUCTO | Variantes de bajo peso molecular | | | | | | | |
| SEC | IDENTIDAD | Estructura primaria (peso molecular) | √ | - | - | - | - | - | √ |
| | PUREZA / IMPUREZAS DE PRODUCTO | Variantes de alto peso molecular | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| RP (Fase reversa) | PUREZA / IMPUREZAS DE PRODUCTO | Oxidación | - | √ | √ | √ | √ | - | √ |
| BRADFORD | CONTENIDO | Concentración de proteína total | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| ELISA QG31 | CONTENIDO | Concentración de QG31 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| HCPs (ELISA) | IMPUREZAS DE PROCESO | Proteínas de la célula hospedadora (Host cell proteins (HCPs)) | - | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| CUANTIFICACIÓN DE ENDOTOXINAS (LAL) | IMPUREZAS DE PROCESO | Endotoxinas | - | √ | √ | √ | √ | √ | √ |

3.2.1. SDS-PAGE

En este apartado se explicará la técnica SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida). Esta técnica se empleó para estudiar la identidad y la pureza de QG31, así como de las impurezas (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Parámetros para la cualificación del método analítico SDS-PAGE. LD: Límite de Detección. LC: Límite de Cuantificación. Lin.: Linealidad. RL: Rango Lineal. Prec.: Precisión. Exac.: Exactitud. Selec.: Selectividad. "√": parámetros estudiados. "-": parámetros no estudiados.

| MÉTODO ANALÍTICO | PARÁMETRO DE ESPECIFICACIÓN | ATRIBUTO DE CALIDAD | ANÁLISIS PARA LA PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA | PARÁMETROS DE CUALIFICACIÓN DE LA TÉCNICA | | | | | | |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--|---|----|------|----|-------|-------|--------|
| | | | | LD | LC | Lin. | RL | Prec. | Exac. | Selec. |
| SDS-PAGE | IDENTIDAD | Estructura primaria (peso molecular) | - Control de destinción - Porcentaje de acrilamida | √ | √ | - | - | √ | - | √ |
| | PUREZA / IMPUREZAS DE PRODUCTO | Variantes de alto peso molecular | - Efecto del pH del tampón en la polimerización de los geles de acrilamida | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| | | Variantes de bajo peso molecular | | | | | | | | |

Por su rapidez y eficacia, esta técnica fue utilizada en la mayor parte del desarrollo de la fermentación y la purificación para estudiar la identidad y la pureza.

Con esta técnica se analizó:

- *Raw volume* (intensidad de la banda). Es una medida del programa de análisis por densitometría (GeneTools) de la intensidad de una banda determinada.
- Movilidad relativa (*Rf*) que se calcula como la distancia migrada por la proteína dividida entre la distancia migrada por el frente.
- Peso molecular (*MW*, del inglés *Molecular Weight*) de la banda, extrapolado a partir de la migración de los marcadores de pesos moleculares.

3.2.1.1. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO SDS-PAGE

Control de destinción

Para comprobar que el proceso de la técnica (electroforesis, tinción y destinción) había funcionado correctamente, se cargó en una de las calles de cada gel un control interno ("Control de destinción") constituido por 3 µg de BSA. Tras desteñir el gel y obtener la imagen del mismo, se cuantificó mediante densitometría el peso molecular y *Raw Volume* (intensidad de la banda) de dicha muestra en cada gel comprobando que no superara los límites superior e inferior establecidos.

Porcentaje de acrilamida de los geles SDS-PAGE

Estudios iniciales establecieron la concentración del 12.5 % de acrilamida como la idónea para realizar el análisis de QG31 mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras (con β-mercaptoetanol) y no reductoras (sin β-mercaptoetanol) de las muestras de proceso.

Como marcador de pesos moleculares se empleó el "Low Molecular Weight Calibration kit for SDS Electrophoresis" (GE Healthcare), al que se añadió la proteína aprotinina (cuyo peso molecular es 6.5 kDa) para cumplir la especificación de la Farmacopea Europea que establece que los marcadores deben estar distribuidos a lo largo de más del 80 % de la longitud del gel.

La caracterización inicial del proceso de purificación de QG31 (apartado "3.2 Primera Fase de desarrollo"), en el que se identificaron contaminantes con pesos moleculares ligeramente inferiores a QG31, hizo necesario incluir otro porcentaje de acrilamida para poder caracterizar dichos contaminantes durante el proceso productivo. Con el objetivo de averiguar el porcentaje de acrilamida idóneo para separar y caracterizar dichos contaminantes, se cargaron diferentes concentraciones de QG31 en geles de acrilamida de entre 6 % y 11 % de acrilamida. Se observó también la necesidad de utilizar otros marcadores de peso molecular ya que en estos porcentajes únicamente son visibles 3-4 bandas de los marcadores y no se cumplía el criterio de la Farmacopea de cubrir el 80 % del rango del gel. Con este fin, se añadió a los marcadores "Low Molecular Weight" (LMW), una alícuota de los marcadores "High Molecular Weight" (HMW) (GE Healthcare) (ver apartado "2.3.1. SDS-PAGE + Tinción de Coomassie"). Dicha mezcla se denominó "Mix MW".

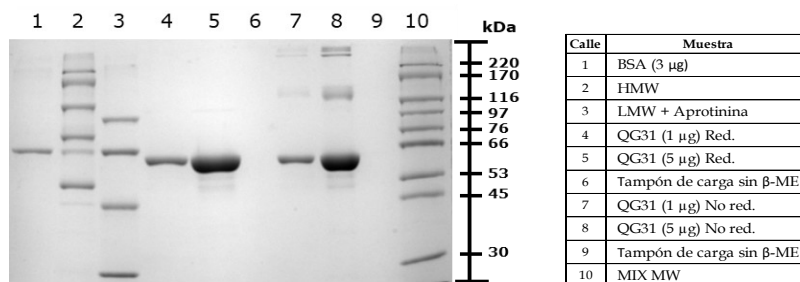


Figura 3.9. Estudio de los marcadores de peso molecular en geles del 8 % de acrilamida. Izquierda: SDS-PAGE 8 % acrilamida. Derecha: muestras cargadas en el gel.

Se concluyó que el porcentaje de acrilamida óptimo para visualizar todas las variantes de bajo peso molecular era 8 % (Figura 3.18) y que la mezcla de pesos moleculares “Mix MW” permitía cumplir las especificaciones de Farmacopea.

Efecto del pH del tampón Tris en la polimerización de los geles

Con el objetivo de controlar la polimerización de los geles de modo que el resultado del tamaño molecular obtenido fuera constante y reproducible, se analizó el efecto del pH del tampón Tris tanto en el gel apilador como en el separador al polimerizar los geles de acrilamida.

Se polimerizaron geles empleando Tris a diferentes pH (además de a pH 8.8) para preparar el gel apilador. Para cada porcentaje de acrilamida se cargó su marcador correspondiente (Figura 3.19).

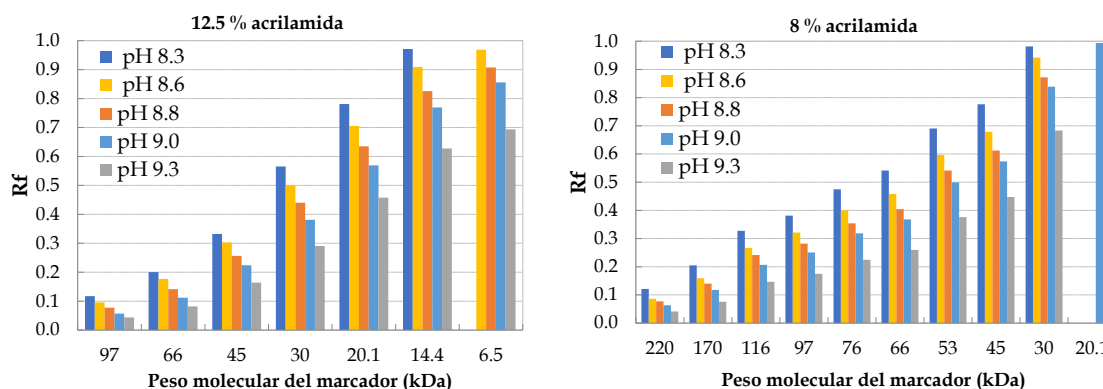


Figura 3.10. Efecto del pH del gel separador en geles SDS-PAGE sobre la movilidad de los marcadores de peso molecular. Panel izquierdo: SDS-PAGE 12.5 % acrilamida. Panel derecho: SDS-PAGE 8 % acrilamida. Se muestra el R_f de cada marcador en función del pH del gel separador (pH del gel apilador: 6.8).

Tras calcular la variación en el R_f de los marcadores a diferentes pH respecto a 8.8, se concluyó que el pH del gel separador (tanto al 12.5 % como al 8 % de acrilamida) debía ser 8.8 ± 0.1 para que la variación en el R_f de los marcadores de peso molecular fuera inferior al 20 %. También se analizó el efecto del pH del gel apilador, pero éste no tuvo ningún efecto sobre la movilidad (R_f) de los marcadores de peso molecular (datos no mostrados).

3.2.1.2. CUALIFICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO SDS-PAGE

Una vez se hubo desarrollado el método de SDS-PAGE en cuatro condiciones (geles en condiciones reductoras y no reductoras del 8 % y del 12.5 % de acrilamida), la técnica se cualificó

estudiando su linealidad, exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación y selectividad (Tabla 3.4). Para ello se cargaron diferentes cantidades de producto terminado QG31 (apartado “3.2. Primera fase de desarrollo”) (desde 10 µg a 0.48 ng) por triplicado para cada una de las cuatro condiciones (porcentajes de acrilamida de 8 % y 12 % y condiciones reductoras y no reductoras).

Linealidad, rango lineal

Para establecer el rango lineal se seleccionaron las condiciones (µg QG31) en las que se cumplía exactitud y precisión 75-125 %. La exactitud se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Exactitud} = (\text{Row Vol. cuantificado} - \text{Row Vol. según recta}) * 100 / \text{Row Vol. según recta}$$

Tabla 3.4. Linealidad y rango lineal en geles SDS-PAGE al 12.5 % de acrilamida (condiciones reductoras y no reductoras). Los valores en negrita indican los valores empleados para la recta de regresión obtenida al representar el promedio del “Raw Vol.” (n=3) frente a la concentración de QG31.

| | | [QG31] (µg) | | | | | |
|--|--|-------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------|---------|
| | | 1.0 | 0.50 | 0.250 | 0.125 | 0.063 | 0.031 |
| 12.5 % ACRILAMIDA (Cond. Reductoras) | Promedio Raw Vol. (n = 3) | 10 881 295 | 4 592 152 | 2 334 058 | 1 157 420 | 482 191 | 176 105 |
| | Exactitud (%) | 97.7 | 110.5 | 101.7 | 84.2 | 44.9 | 731.7 |
| | Precisión (100 - CV) (%) | 85.8 | 86.2 | 76.2 | 85.6 | 86.5 | 77.3 |
| | Rango lineal (cumple exactitud y precisión 75 - 125%): | √ | √ | √ | √ | - | - |
| | Recta de regresión (1 a 0.0625 µg): | Pendiente: | 11 010 654 | Ordenada en el origen: | -377 205 | R ² = | 0.9943 |

| | | [QG31] (µg) | | | | | |
|---|--|------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------|--------|
| | | 1.0 | 0.50 | 0.250 | 0.125 | 0.063 | 0.031 |
| 12.5 % ACRILAMIDA (Cond. no red.) | Promedio Raw Vol. (n = 3) | 8 437 326 | 4 654 542 | 2 278 495 | 1 279 903 | 461 309 | 87 765 |
| | Exactitud (%) | 102.1 | 92.7 | 96.3 | 86.5 | 122.1 | 173.0 |
| | Precisión (100 - CV) (%) | 90.5 | 75.5 | 87.5 | 85.0 | 61.9 | 58.2 |
| | Rango lineal (cumple exactitud y precisión 75 - 125%): | √ | √ | √ | √ | - | - |
| | Recta de regresión (1 a 0.031 µg): | Pendiente: | 8 562 080 | Ordenada en el origen: | 57 123 | R ² = | 0.9953 |

Tabla 3.5. Linealidad y rango lineal en geles SDS-PAGE al 8 % de acrilamida (condiciones reductoras y no reductoras). Los valores en negrita indican los valores empleados para la recta de regresión obtenida al representar el promedio del Raw Vol. (n=3) frente a la concentración de QG31.

| | | [QG31] (µg) | | | | | |
|--------------------------------------|--|-------------------|------------------|------------------------|------------------|------------------|----------------|
| | | 2 | 1.0 | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.063 |
| 8 % ACRILAMIDA (Cond. Reductoras) | Promedio Raw Vol. (n = 3) | 19 001 736 | 9 506 519 | 4 603 883 | 1 927 253 | 788 523 | 312 878 |
| | Exactitud (%) | 100.4 | 98.5 | 97.8 | 107.2 | 108.6 | 77.7 |
| | Precisión (100 - CV) (%) | 94.0 | 91.3 | 93.1 | 92.4 | 89.3 | 81.4 |
| | Rango lineal (cumple exactitud y precisión 75 - 125%): | √ | √ | √ | √ | √ | √ |
| | Recta de regresión (2 a 0.0625 µg): | Pendiente: | 9 713 979 | Ordenada en el origen: | -351 333 | R ² = | 0.9997 |

| | | [QG31] (µg) | | | | | |
|---|--|------------------|------------------|------------------------|----------------|------------------|--------|
| | | 1.0 | 0.5 | 0.25 | 0.125 | 0.063 | 0.031 |
| 8 % ACRILAMIDA (Cond. no reductoras) | Promedio Raw Vol. (n = 3) | 7 983 265 | 3 941 511 | 1 500 509 | 688 188 | 227 245 | 99 518 |
| | Exactitud (%) | 100.2 | 96.6 | 112.5 | 96.9 | 42.0 | 284.2 |
| | Precisión (100 - CV) (%) | 88.2 | 86.5 | 75.3 | 92.7 | 71.3 | 68.2 |
| | Rango lineal (cumple exactitud y precisión 75 - 125%): | √ | √ | √ | √ | - | - |
| | Recta de regresión (1 a 0.125 µg): | Pendiente: | 8 382 530 | Ordenada en el origen: | -380 086 | R ² = | 0.9979 |

Se estableció la linealidad (recta de regresión) con los puntos del rango lineal que cumplían exactitud y precisión 75-125 %.

Precisión

Los cálculos de la *precisión intergel* para los parámetros *Raw Vol.*, *Rf* y *MW* (entre los 3 geles analizados) se muestran en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6. Precisión intergel en SDS-PAGE para los parámetros *Raw Vol.*, *Rf* y *MW* (n=3).

| Carga (µg) | ACRILAMIDA 8 % (Cond. Red.) | | | ACRILAMIDA 8 % (Cond. No Red.) | | | ACRILAMIDA 12.5 % (Cond. Red.) | | | ACRILAMIDA 12.5 % (Cond. No Red.) | | |
|------------|-----------------------------|---------|---------------|--------------------------------|---------|---------------|--------------------------------|---------|---------------|-----------------------------------|---------|---------------|
| | Raw Vol. QG31 | Rf QG31 | MW QG31 (kDa) | Raw Vol. QG31 | Rf QG31 | MW QG31 (kDa) | Raw Vol. QG31 | Rf QG31 | MW QG31 (kDa) | Raw Vol. QG31 | Rf QG31 | MW QG31 (kDa) |
| 10 | 97.9 | 96.2 | 97.4 | 87.5 | 96.1 | 97.5 | 90.8 | 98.4 | 99.0 | 85.9 | 93.7 | 96.1 |
| 8 | 94.7 | 97.0 | 98.1 | 91.9 | 97.6 | 96.5 | 94.9 | 97.5 | 98.2 | 89.5 | 94.2 | 96.5 |
| 6 | 92.4 | 97.2 | 98.5 | 92.1 | 96.6 | 97.6 | 93.7 | 98.8 | 99.3 | 98.8 | 95.5 | 97.6 |
| 5 | 97.8 | 98.4 | 98.5 | 97.7 | 96.2 | 98.8 | 93.4 | 98.4 | 98.5 | 97.6 | 95.6 | 98.0 |
| 4 | 89.0 | 97.0 | 97.8 | 98.2 | 95.5 | 98.8 | 95.0 | 98.9 | 99.0 | 94.6 | 93.5 | 96.3 |
| 2 | 86.9 | 98.3 | 98.9 | 98.5 | 96.0 | 99.0 | 91.8 | 98.5 | 98.9 | 98.4 | 96.6 | 98.4 |
| 1 | 94.8 | 97.6 | 99.4 | 94.8 | 94.7 | 99.7 | 94.2 | 99.5 | 99.1 | 98.4 | 96.7 | 99.0 |
| 1 | 93.8 | 99.8 | 98.9 | 89.1 | 98.6 | 99.6 | 80.1 | 97.2 | 99.5 | 90.0 | 91.3 | 99.3 |
| 0.5 | 91.1 | 99.9 | 98.8 | 89.0 | 98.4 | 99.8 | 85.7 | 98.8 | 98.2 | 75.5 | 89.9 | 98.5 |
| 0.25 | 87.7 | 99.5 | 98.6 | 78.1 | 98.2 | 99.8 | 76.2 | 98.7 | 98.5 | 69.1 | 89.9 | 98.7 |
| 0.125 | 88.1 | 99.5 | 99.1 | 92.7 | 98.4 | 99.8 | 84.3 | 98.4 | 98.8 | 84.8 | 91.1 | 99.4 |
| 0.0625 | 83.1 | 99.0 | 99.5 | 85.2 | 98.2 | 99.9 | 86.5 | 99.3 | 97.7 | 64.4 | 90.7 | 99.6 |
| 0.03125 | 74.9 | 98.3 | 98.8 | 96.7 | 96.7 | 99.5 | 39.1 | 97.9 | 97.7 | 62.9 | 91.2 | 99.9 |
| 0.015625 | 70.0 | 99.5 | 99.5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| MAX. | 97.9 | 99.9 | 99.5 | 98.5 | 98.6 | 99.9 | 95.0 | 99.5 | 99.5 | 98.8 | 96.7 | 99.9 |
| MIN. | 70.0 | 96.2 | 97.4 | 78.1 | 94.7 | 96.5 | 39.1 | 97.2 | 97.7 | 62.9 | 89.9 | 96.1 |

Se pudo concluir que en todas las cargas de QG31 entre 10 µg y 0.0615 µg por pocillo, los valores de la precisión intergel del *Rf* (valores entre 89.9 % y 99.9 %) y del peso molecular (*MW*) (valores entre 96.0 % y 99.9 %) cumplen criterio de aceptación de precisión entre 80-120 %.

En el caso del *Raw vol.* se obtuvieron valores de precisión entre 75.5 % y 98.8 % (para las cargas de QG31 entre 10 µg y 0.125 µg por pocillo), por lo que se cumple el criterio de aceptación (precisión entre 75-125 %).

Límite de detección

El límite de detección se estableció como la cantidad más baja de QG31 cargada en gel que era detectable en los geles por el software GeneTools (Tabla 3.6).

El límite de detección se fijó en:

- 31.25 ng de QG31 para las condiciones: 12.5 % de acrilamida (condiciones reductoras y no reductoras) y 8 % de acrilamida en condiciones no reductoras
- 15.625 ng de QG31 en geles al 8 % de acrilamida en condiciones reductoras

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se estableció como la cantidad de QG31 en la que se cumplía exactitud 75 - 125 % (Tablas 3.4 y 3.5).

El límite de cuantificación se fijó en:

- 62.5 ng de QG31 para las condiciones: 8 % de acrilamida (condiciones reductoras y no reductoras) y 12.5 % de acrilamida en condiciones no reductoras
- 31.25 ng de QG31 en geles al 12.5 % de acrilamida en condiciones reductoras

Selectividad

Para evaluar la selectividad, se analizaron el *Raw volumen*, la movilidad relativa (*Rf*) y el peso molecular (MW) de la banda de QG31 preparado en diferentes tampones (efecto matriz). Como tampones a analizar se eligieron los que se podrían emplear durante el desarrollo del proceso de purificación de QG31. Se calculó el porcentaje de variación de cada parámetro en presencia de las distintas soluciones respecto al valor de esos parámetros en PBS (Tabla 3.7.).

Tabla 3.7. Efecto matriz en SDS-PAGE. Se calcula la variación (expresada en porcentaje) del valor experimental en las soluciones seleccionadas respecto al valor de esa condición en tampón PBS.

| Tampón | 8 % ACRILAMIDA | | | | | |
|---|------------------|---------|---------------|---------------------|---------|---------------|
| | Cond. Reductoras | | | Cond. No Reductoras | | |
| | Raw Vol QG31 | Rf QG31 | MW QG31 (kDa) | Raw Vol QG31 | Rf QG31 | MW QG31 (kDa) |
| PBS | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Solución salina (0.9% NaCl) | 102.1 | 100.0 | 100.0 | 97.5 | 99.7 | 100.3 |
| 10mM carbonato sódico, 0.9% NaCl, pH8 | 101.2 | 99.7 | 100.3 | 93.0 | 100.6 | 99.5 |
| 50 mM TrisHCl, 200 mM NaCl, pH8 | 96.1 | 97.6 | 101.9 | 90.3 | 100.0 | 100.0 |
| 50 mM TrisHCl, 400 mM sulfato amónico, pH 8 | 94.4 | 97.3 | 102.1 | 97.6 | 99.1 | 100.8 |
| 50 mM TrisHCl, 1000 mM NaCl, pH 8 | 109.0 | 98.0 | 101.6 | 109.0 | 98.8 | 101.0 |

| Tampón | 12.5 % ACRILAMIDA | | | | | |
|---|-------------------|---------|---------------|---------------------|---------|---------------|
| | Cond. Reductoras | | | Cond. No Reductoras | | |
| | Raw Vol QG31 | Rf QG31 | MW QG31 (kDa) | Raw Vol QG31 | Rf QG31 | MW QG31 (kDa) |
| PBS | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| Solución salina (0.9% NaCl) | 99.8 | 100.0 | 100.0 | 93.1 | 98.1 | 101.9 |
| 10mM carbonato sódico, 0.9% NaCl, pH8 | 100.6 | 100.0 | 100.0 | 92.9 | 98.3 | 101.0 |
| 50 mM TrisHCl, 200 mM NaCl, pH8 | 96.2 | 97.8 | 101.5 | 89.6 | 99.2 | 100.5 |
| 50 mM TrisHCl, 400 mM sulfato amónico, pH 8 | 95.5 | 99.2 | 100.5 | 106.7 | 101.7 | 99.0 |
| 50 mM TrisHCl, 1000 mM NaCl, pH 8 | 106.9 | 99.2 | 100.5 | 114.6 | 103.9 | 97.6 |

Se concluyó que la variación del *Raw vol.*, *Rf* y MW de QG31 en SDS-PAGE reductor y no reductor tanto al 8 % como al 12.5 % de acrilamida en los tampones analizados (Tabla 3.7) está entre 80 y 120 % respecto a los valores obtenidos en tampón PBS.

Conclusiones

El resumen de las especificaciones para la técnica de SDS-PAGE se muestra en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Especificaciones del método analítico SDS-PAGE.

| METODO ANALITICO | ESPECIFICACIONES TÉCNICAS | RANGO LINEAL | LC (Límite de cuantificación) | LD (Límite de detección) | PRECISIÓN | EXACTITUD |
|------------------|-----------------------------|---------------|-------------------------------|--------------------------|-----------|-----------|
| SDS-PAGE | 12.5 % acr. / Cond. red. | 0.125 - 1 µg | 31.25 ng QG31 | 31.25 ng QG31 | 75-125 % | 80-120 % |
| | 12.5 % acr. / Cond. no red. | 0.125 - 1 µg | 62.5 ng QG31 | 31.25 ng QG31 | 75-125 % | 80-120 % |
| | 8 % acr. / Cond. red. | 0.0625 - 2 µg | 62.5 ng QG31 | 15.625 ng QG31 | 75-125 % | 80-120 % |
| | 8 % acr. / Cond. no red. | 0.0625 - 1 µg | 62.5 ng QG31 | 31.25 ng QG31 | 75-125 % | 80-120 % |

3.2.2. Western blot

En este apartado se explica la técnica Western blot, que se utilizó para la identificación de QG31 y sus formas multiméricas y degradadas (Tabla 3.9). Por su rapidez y eficacia, esta técnica fue utilizada, principal pero no únicamente, en las muestras iniciales en las que la menor pureza relativa de QG31 complicaba la identificación de bandas individuales.

Tabla 3.9. Parámetros para la cualificación del método analítico Western-blot.

| MÉTODO ANALÍTICO | PARÁMETRO DE ESPECIFICACIÓN | ATRIBUTO DE CALIDAD | ANÁLISIS PARA LA PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA | PARÁMETROS DE CUALIFICACIÓN DE LA TÉCNICA | | |
|------------------|--------------------------------|---|---|---|-----------|--------------|
| | | | | LD | Precisión | Selectividad |
| WESTERN BLOT | IDENTIDAD | Identidad inmunológica (peso molecular) | <ul style="list-style-type: none"> - Selección de anticuerpo - Porcentaje de acrilamida - Efecto del pH del tampón en la polimerización de los geles de acrilamida - Transferencia a amembrana PVDF | √ | √ | √ |
| | PUREZA / IMPUREZAS DE PRODUCTO | Variantes de bajo peso molecular | | | | |

3.2.2.1. DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO WESTERN BLOT

Respecto a la técnica de Western blot previo a la cualificación de la técnica se estudió la capacidad de diferentes anticuerpos de reconocer específicamente QG31, así como las condiciones óptimas de transferencia a membrana.

Selección de un anticuerpo específico

Se estudió la capacidad de 4 anticuerpos (ROXALL Medicina España) para identificar QG31:

- Anticuerpo primario monoclonal anti-Phl p 5 10B1 (purificado a partir del sobrenadante de hibridoma (ratón) mediante cromatografía de afinidad a proteína G)
- Anticuerpo policlonal anti-Phl p 5 (obtenido en conejos)
- Anticuerpo policlonal anti-Lol p 1 (obtenido en conejos)
- Anticuerpo policlonal anti-QG31 (obtenido en conejos mediante inyección de QG31 purificada durante el POC, ver más adelante)

Se concluyó que el anticuerpo monoclonal Anti-Phl p 5 10B1 era específico de la proteína híbrida QG31 y no detectaba inespecíficamente proteínas de la cepa de expresión de *E. coli* (datos no mostrados).

Transferencia a membrana

Se estudiaron las condiciones óptimas para la transferencia a membrana (membranas PVDF Immuno-Blot en equipos "Trans-Blot Turbo Transfer System" (BIO-RAD)) de QG31 con el anticuerpo anteriormente seleccionado, anti-Phl p 5 monoclonal, estableciéndose que el método de transferencia más eficaz para transferir todas las bandas de todo el rango de pesos moleculares era el Standard SD (incluido en el equipo Trans-Blot Turbo Transfer System (BIO-RAD), y que consiste en voltaje constante de 25 V durante 30 min).

3.2.2.2. CUALIFICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO WESTERN BLOT

Una vez se hubo desarrollado el método de Western blot, la técnica se cualificó estudiando su precisión, límite de detección y selectividad (Tabla 3.9).

Para ello se cargaron diferentes cantidades de producto terminado QG31 (ver apartado "3.2. Primera fase de desarrollo") (desde 5 µg a 0.1 ng) en 3 geles de cada condición (porcentajes de acrilamida de 8 % y 12.5 % y condiciones reductoras y no reductoras).

Precisión

Los cálculos de la *precisión intergel* para el parámetro MW (entre los 3 geles analizados) se muestran en la Tabla 3.10.

Tabla 3.10. Precisión intergel en Western blot para el parámetro MW (n=3). ND = no detectado.

| Cantidad aplicada (µg) | 8 % acrilamida | | 12.5 % acrilamida | |
|------------------------|------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| | Cond. reductoras | Cond. no reductoras | Cond. reductoras | Cond. no reductoras |
| 5 | 94.8 | 98.6 | 97.0 | 94.3 |
| 1 | 97.5 | 95.7 | 95.0 | 94.9 |
| 0.5 | 96.6 | 94.4 | 93.0 | 94.9 |
| 0.1 | 97.3 | 92.5 | 90.4 | 92.6 |
| 0.05 | 97.5 | 90.0 | 88.6 | 91.4 |
| 0.01 | ND | ND | 82.1 | 90.5 |
| 0.005 | ND | ND | ND | ND |
| 0.001 | ND | ND | ND | ND |
| VALOR MAX. | 97.5 | 98.6 | 97.0 | 94.9 |
| VALOR MIN. | 94.8 | 90.0 | 82.1 | 90.5 |

Se concluyó que la precisión intergel del peso molecular fue entre 82.15 % y 98.8 % en todas las condiciones, por lo que se cumplía el criterio de aceptación de precisión entre 80 % y 120 %.

Límite de detección (LD)

Con el objetivo de conocer el límite de detección de QG31 en las condiciones establecidas para el Western-blot, se cargaron (en 3 geles) diferentes cantidades de QG31: desde 5 a 0.001 µg (Figura 3.20, sólo se muestra uno de las tres membranas de cada condición) para establecer una primera aproximación, y desde 0.1 a 0.0025 µg para ajustar el límite de detección (datos no mostrados).

El límite de detección se fijó en:

- 10 ng/calle en geles del 12.5 % (reductor y no reductor).
- 12.5 ng/calle en geles del 8 % (reductor y no reductor).

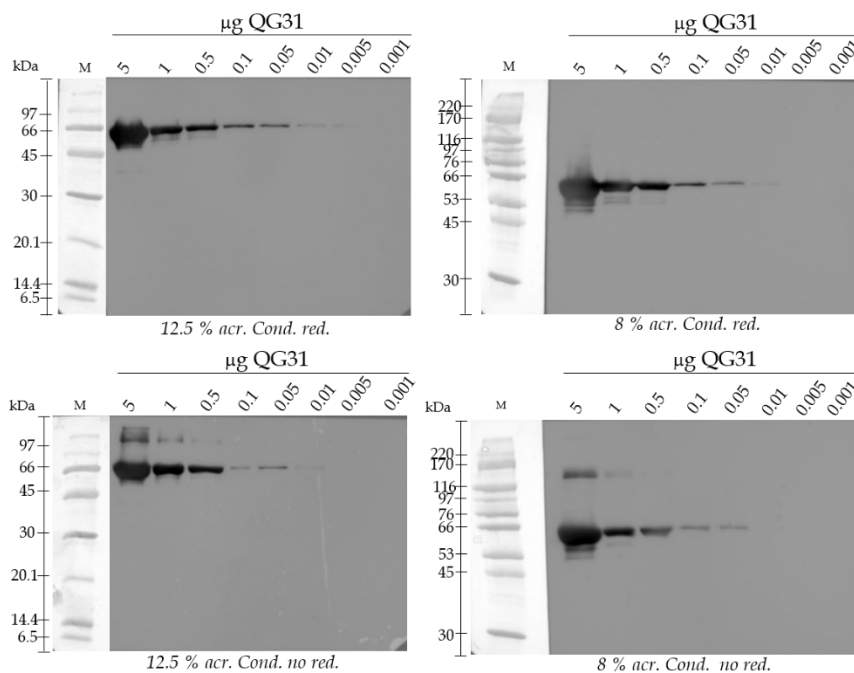


Figura 3.11. Determinación del límite de detección en Western blot.

Selectividad

Para evaluar la selectividad, se analizó el peso molecular (MW) de la banda de QG31 preparado en diferentes soluciones (efecto matriz). Se calculó el porcentaje de variación de cada parámetro en presencia de las distintas soluciones respecto al valor de esos parámetros en PBS (Tabla 3.11). Como soluciones a analizar se eligieron las que se podrían emplear durante el desarrollo del proceso de sobreexpresión y purificación.

Tabla 3.11. Selectividad (efecto matriz) en Western blot. Se calcula la variación (expresada en porcentaje) del valor experimental en las soluciones seleccionadas respecto al valor de esa condición en tampón PBS.

| TAMPON | 8 % ACRILAMIDA | | 12.5 % ACRILAMIDA | |
|---|------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| | Cond. Reductoras | Cond. No Reductoras | Cond. Reductoras | Cond. No Reductoras |
| PBS | 100.0 | 100.0 | 100.3 | 101.2 |
| Solución salina (0.9% NaCl) | 100.3 | 98.7 | 100.0 | 100.0 |
| 10mM carbonato sódico, 0.9% NaCl, pH 8 | 90.7 | 98.3 | 90.7 | 98.8 |
| 50 mM TrisHCl, 200 mM NaCl, pH 8 | 89.7 | 92.7 | 89.7 | 99.4 |
| 50 mM TrisHCl, 400 mM sulfato amónico, pH 8 | 91.6 | 96.4 | 91.6 | 98.3 |
| 50 mM TrisHCl, 1000 mM NaCl, pH 8 | 94.9 | 102.0 | 94.9 | 97.1 |

De estos ensayos se pudo concluir que la variación del peso molecular (MW) de QG31 en las 4 condiciones de geles del Western blot (12.5 y 8 % acrilamida en condiciones reductoras y no reductoras) para todos los tampones estudiados estaba entre el 80 y 120 % respecto a los valores obtenidos en tampón PBS.

Conclusiones

El resumen de las conclusiones para la técnica de Western blot se muestra en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12. Especificaciones del método analítico Western blot.

| METODO ANALÍTICO | ESPECIFICACIONES TÉCNICAS | LD (Límite de detección) |
|------------------|---------------------------|--------------------------|
| Western Blot | 8 % R | 12.5 ng QG31 |
| | 8 % NR | 12.5 ng QG31 |
| | 12.5 % R | 10 ng QG31 |
| | 12.5 % NR | 10 ng QG31 |

3.2.3. Cuantificación de proteína total por Bradford

La técnica de Bradford se empleó para cuantificar el contenido en proteína total de las muestras analíticas a lo largo del proceso. Para cualificar la técnica se analizaron la linealidad, rango lineal, precisión, exactitud, límite de detección y de cuantificación y selectividad (efecto matriz) (Tabla 3.13).

Tabla 3.13. Parámetros para la cualificación del método analítico "Cuantificación de proteína total por Bradford".

| MÉTODO ANALÍTICO | PARÁMETRO DE ESPECIFICACIÓN | ATRIBUTO DE CALIDAD | PARÁMETROS DE CUALIFICACIÓN DE LA TÉCNICA | | | | | | |
|------------------|-----------------------------|---------------------------------|---|----|------------|--------------|-----------|-----------|--------------|
| | | | LD | LC | Linealidad | Rango lineal | Precisión | Exactitud | Selectividad |
| BRADFORD | CONTENIDO | Concentración de proteína total | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |

Linealidad, rango lineal, límite de cuantificación (LC) y límite de detección (LD)

Se realizaron 3 placas en las que se analizaron por sextuplicado en cada placa las siguientes concentraciones de BSA: 200, 150, 100, 80, 60, 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 µg/mL.

El análisis de los resultados se muestra en la Tabla 3.14.

Tabla 3.14. Estudio de la linealidad, rango lineal, LC y LD en la cuantificación de proteína total por Bradford. Los valores en negrita indican los valores empleados para la recta de regresión obtenida al representar el promedio de la absorbancia a 595 nm (n=6) frente a la concentración de QG31.

| | | [BSA] (µg/mL) | | | | | | | | | | | | |
|---------|---|---------------|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------------|--------------|-------|---------|-------|--------------------------|--|
| | | 200 | 150 | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 10 | 5 | 2.5 | 1.25 | 0.625 | |
| PLACA 1 | Promedio Abs _{595nm} (n = 6) | 1.144 | 1.002 | 0.773 | 0.642 | 0.459 | 0.327 | 0.176 | 0.089 | 0.046 | 0.025 | 0.010 | -0.016 | |
| | Exactitud (%) | 74.0 | 86.2 | 99.3 | 102.5 | 96.6 | 101.6 | 104.0 | 93.2 | 75.2 | 37.4 | -79.3 | -708.6 | |
| | Precisión (100 - CV) (%) | 99.2 | 96.9 | 95.5 | 98.7 | 97.3 | 97.8 | 97.0 | 98.0 | 90.6 | 85.2 | 70.5 | 163.3 | |
| | Rango lineal (cumple exactitud y precisión 80 - 120%): | - | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | - | - | - | - | |
| | Recta de regresión (100 a 10 µg/mL): | Pendiente: | | | 0.00761 | | | Ordenada en el origen | | | 0.01759 | | R ² = 0.99831 | |
| | Límite de Cuantificación (menor valor con precisión y exactitud 75-125%): | 5 µg/mL | | | | | | | | | | | | |
| | Límite de Detección [3.3 x (Desv. Est. Blancos) / (pendiente recta regresión)]: | 2.66 µg/mL | | | | | | | | | | | | |

| | | [BSA] (µg/mL) | | | | | | | | | | | | |
|---------|---|---------------|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------------|--------------|-------|---------|-------|--------------------------|--|
| | | 200 | 150 | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 10 | 5 | 2.5 | 1.25 | 0.625 | |
| PLACA 2 | Promedio Abs _{595nm} (n = 6) | 1.124 | 0.959 | 0.743 | 0.603 | 0.461 | 0.301 | 0.167 | 0.074 | 0.037 | 0.017 | 0.012 | 0.003 | |
| | Exactitud (%) | 75.4 | 85.6 | 99.3 | 100.4 | 101.7 | 98.6 | 106.3 | 87.4 | 74.2 | 38.4 | 26.3 | -138.6 | |
| | Precisión (100 - CV) (%) | 98.2 | 96.5 | 98.6 | 94.3 | 96.6 | 97.2 | 94.7 | 93.0 | 89.6 | 65.1 | 51.8 | -69.1 | |
| | Rango lineal (cumple exactitud y precisión 80 - 120%): | - | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | - | - | - | - | |
| | Recta de regresión (100 a 10 µg/mL): | Pendiente: | | | 0.00738 | | | Ordenada en el origen | | | 0.00977 | | R ² = 0.99915 | |
| | Límite de Cuantificación (menor valor con precisión y exactitud 75-125%): | 10 µg/mL | | | | | | | | | | | | |
| | Límite de Detección [3.3 x (Desv. Est. Blancos) / (pendiente recta regresión)]: | 2.17 µg/mL | | | | | | | | | | | | |

| | | [BSA] (µg/mL) | | | | | | | | | | | | |
|---------|---|---------------|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------------|--------------|-------|---------|-------|--------------------------|--|
| | | 200 | 150 | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 10 | 5 | 2.5 | 1.25 | 0.625 | |
| PLACA 3 | Promedio Abs _{595nm} (n = 6) | 1.133 | 0.989 | 0.787 | 0.642 | 0.506 | 0.351 | 0.161 | 0.081 | 0.035 | 0.015 | 0.007 | 0.005 | |
| | Exactitud (%) | 71.0 | 82.5 | 98.1 | 99.7 | 104.0 | 106.7 | 93.3 | 83.9 | 52.2 | 0.3 | -80.7 | -188.4 | |
| | Precisión (100 - CV) (%) | 98.8 | 98.8 | 98.7 | 99.1 | 99.3 | 98.9 | 93.3 | 96.8 | 97.9 | 85.8 | 79.3 | 53.4 | |
| | Rango lineal (cumple exactitud y precisión 80 - 120%): | - | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ | - | - | - | - | |
| | Recta de regresión (100 a 10 µg/mL): | Pendiente: | | | 0.00788 | | | Ordenada en el origen | | | 0.01453 | | R ² = 0.99654 | |
| | Límite de Cuantificación (menor valor con precisión y exactitud 75-125%): | 10 µg/mL | | | | | | | | | | | | |
| | Límite de Detección [3.3 x (Desv. Est. Blancos) / (pendiente recta regresión)]: | 1.09 µg/mL | | | | | | | | | | | | |

La exactitud se midió mediante la fórmula:

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{Conc. según recta}}{\text{Conc. teórica}} \times 100$$

siendo la "C media determinada" la concentración calculada según la recta de regresión mencionada.

En este apartado, teniendo en cuenta el peor caso de los resultados de las 3 placas ensayadas, se pudo concluir que:

- La *exactitud* de las concentraciones de BSA entre **100 y 20 µg/mL** fue **90-110 %** respecto al valor nominal
- El *rango lineal* sería desde 100 hasta 20 µg/mL BSA, si el criterio de aceptación fuera exactitud 90-110 % y precisión 90-110 %
- El límite de detección (LD) fue 2.66 µg/mL de BSA

- El límite de cuantificación (LC) fue 10 µg/mL de BSA utilizando el criterio del menor valor de la recta que cumplía 75-125 % para exactitud y precisión
- La recta patrón comprendía los valores 100, 80, 60, 40, 20 y 10 µg/mL de BSA (rango lineal). Para una exactitud 90-110 % se realizaría la recta 100, 80, 60, 40, 20 y 10 µg/mL BSA y se cuantificarían las muestras que estuvieran en el intervalo 100 a 20 µg/mL.

Precisión intraplaca e interplaca

La precisión se calculó intra e interplaca (Tabla 3.15) analizando el coeficiente de variación entre las medidas dentro de cada placa y entre las distintas placas del apartado anterior.

Tabla 3.15. Precisión intraplaca (tabla superior) e interplaca (tabla inferior) en la cuantificación de proteína total por Bradford.

| | | [BSA] (µg/mL): | | | | | | | | | | | |
|-----------------|---------------------------------------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 200 | 150 | 100 | 80 | 60 | 40 | 20 | 10 | 5 | 2.5 | 1.25 | 0.625 |
| PLACA 1 | Promedio Abs _{595nm} (n = 6) | 1.530 | 1.388 | 1.159 | 1.028 | 0.845 | 0.713 | 0.562 | 0.475 | 0.432 | 0.411 | 0.396 | 0.370 |
| | Desv. Est. | 0.010 | 0.032 | 0.034 | 0.008 | 0.013 | 0.007 | 0.005 | 0.002 | 0.004 | 0.004 | 0.003 | 0.010 |
| | CV (%) | 0.6 | 2.3 | 3.0 | 0.8 | 1.5 | 1.0 | 0.9 | 0.4 | 1.0 | 0.9 | 0.7 | 2.8 |
| PLACA 2 | Promedio Abs _{595nm} (n = 6) | 1.522 | 1.356 | 1.141 | 1.001 | 0.858 | 0.699 | 0.564 | 0.472 | 0.435 | 0.414 | 0.410 | 0.401 |
| | Desv. Est. | 0.020 | 0.033 | 0.011 | 0.034 | 0.016 | 0.008 | 0.009 | 0.005 | 0.004 | 0.006 | 0.006 | 0.006 |
| | CV (%) | 1.3 | 2.4 | 0.9 | 3.4 | 1.8 | 1.2 | 1.6 | 1.1 | 0.9 | 1.4 | 1.4 | 1.4 |
| PLACA 3 | Promedio Abs _{595nm} (n = 6) | 1.531 | 1.387 | 1.185 | 1.040 | 0.904 | 0.749 | 0.559 | 0.478 | 0.433 | 0.412 | 0.404 | 0.403 |
| | Desv. Est. | 0.014 | 0.012 | 0.010 | 0.006 | 0.003 | 0.004 | 0.011 | 0.003 | 0.001 | 0.002 | 0.001 | 0.002 |
| | CV (%) | 0.9 | 0.8 | 0.9 | 0.5 | 0.4 | 0.5 | 1.9 | 0.5 | 0.2 | 0.5 | 0.3 | 0.6 |
| PLACAS 1, 2 Y 3 | Promedio Abs _{595nm} (n=3) | 1.528 | 1.377 | 1.162 | 1.023 | 0.869 | 0.720 | 0.562 | 0.475 | 0.433 | 0.412 | 0.403 | 0.391 |
| | Desv. Est. | 0.005 | 0.018 | 0.022 | 0.020 | 0.031 | 0.026 | 0.003 | 0.003 | 0.001 | 0.002 | 0.007 | 0.019 |
| | CV (%) | 0.3 | 1.3 | 1.9 | 2.0 | 3.6 | 3.6 | 0.5 | 0.7 | 0.3 | 0.4 | 1.7 | 4.7 |

Se concluyó que, en todas las concentraciones de BSA ensayadas (200 µg/mL hasta 0.625 µg/mL), tanto la precisión intraplaca (CV<4 %) como la precisión interplaca (CV<5 %) cumplían el criterio de aceptación: CV<20 %.

Repetibilidad

La repetibilidad se estudió realizando 6 lecturas de la placa 1 (Tabla 3.14). El coeficiente de variación en las 6 repeticiones consecutivas de la medida a 595 nm en todos los pocillos del experimento no superó el 1 %, por lo que se cumplía el criterio de aceptación (<10 %) (datos no mostrados).

Exactitud

La exactitud se midió:

- a) **por patrones**, cuantificando 3 concentraciones de BSA en las partes baja, media y alta de la recta (Tabla 3.16) por sextuplicado mediante la fórmula:

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{Conc. media determinada}}{\text{Conc. teórica}} \times 100$$

Tabla 3.16. Medida de la exactitud por patrones (cuantificación de proteína total por Bradford).

| [BSA] (µg/mL) | Conc. 1 (µg/mL) | Conc. 2 (µg/mL) | Conc. 3 (µg/mL) | Conc. 4 (µg/mL) | Conc. 5 (µg/mL) | Conc. 6 (µg/mL) | Promedio conc. (µg/mL) | CV (%) | Exactitud (%) |
|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------|--------|---------------|
| 20 | 18.29 | 18.85 | 19.13 | 18.99 | 18.85 | 18.29 | 18.74 | 1.92 | 93.69 |
| 60 | 59.09 | 56.57 | 58.25 | 59.65 | 58.25 | 58.53 | 58.39 | 1.79 | 97.31 |
| 100 | 94.56 | 94.56 | 93.30 | 94.98 | 96.66 | 94.00 | 94.67 | 1.20 | 94.67 |

b) por el método de adiciones y posterior estudio de las recuperaciones (cuantificando una mezcla de QG31 y BSA y calculando la recuperación, ver Tabla 3.17) mediante la fórmula:

$$\text{Exactitud (Recuperación)} = \frac{\text{Conc.} \cdot (\text{Muestra} + \text{Adicionada}) - \text{Conc.} \cdot \text{Muestra}}{\text{Conc.} \cdot \text{Adicionada}} \times 100$$

Tabla 3.17. Medida de la exactitud por el método de adiciones y posterior estudio de las recuperaciones (cuantificación de proteína total por Bradford).

| Muestra | Conc. 1 (µg/mL) | Conc. 2 (µg/mL) | Conc. 3 (µg/mL) | Conc. 4 (µg/mL) | Conc. 5 (µg/mL) | Conc. 6 (µg/mL) | Promedio conc. (µg/mL) | CV (%) | Exactitud (%) |
|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------|--------|---------------|
| QG31 40 µg/mL | 33.85 | 34.13 | 33.57 | 34.70 | 35.68 | 34.98 | 34.49 | 2.27 | - |
| QG31 40 µg/mL + BSA 10 µg/mL | 35.12 | 37.08 | 37.22 | 38.06 | 35.40 | 37.50 | 36.73 | 3.25 | 22.43 |
| QG31 40 µg/mL + BSA 20 µg/mL | 55.02 | 52.50 | 54.88 | 52.92 | 53.06 | 53.06 | 53.57 | 2.03 | 95.45 |
| QG31 40 µg/mL + BSA 40 µg/mL | 74.93 | 69.74 | 75.35 | 73.39 | 72.83 | 74.09 | 73.39 | 2.75 | 97.26 |

Para las concentraciones de BSA 20 y 40 µg/mL se cumplía el criterio de 80-120 % de exactitud. Por ello se concluyó que el rango idóneo para la cuantificación de proteínas utilizando la recta patrón de BSA fuera desde 100 µg/mL hasta 20 µg/mL.

Selectividad

Respecto a la *selectividad*, se identificaron los compuestos que potencialmente se podrían utilizar en el proceso de purificación de QG31 y se estudió el efecto de dichas matrices sobre la cuantificación de proteína total. Concretamente, se determinó el efecto de diferentes concentraciones de NaCl (en 2 mM Tris-HCl, pH8); sulfato amónico (en 2 mM Tris-HCl, pH 8); Tris-HCl, pH 8; fosfato sódico, pH 8; carbonato sódico, pH 8; acetato sódico, pH 5.5 y citrato sódico, pH 5.5.

Se cuantificó por Bradford una muestra de QG31 a una concentración fija (40 µg/mL) preparada en diferentes concentraciones de las matrices mencionadas anteriormente. Para cada valor experimental de concentración, asociado a una concentración determinada de diluyente, se calculó la exactitud respecto al control (QG31 diluida en agua). Los resultados se muestran en la Tabla 3.18.

Tabla 3.18. Selectividad (efecto matriz) en la cuantificación de proteína total por Bradford. En cursiva se muestran los valores en los que la medida se vio afectada en más de un 20 %.

| | | | | | | | |
|--------------------------------|---------------|--------------|-----------------------------------|------------------------------|---------------|--------------|-----------------------------------|
| [NaCl] (mM) | Conc. (µg/mL) | CV (%) Conc. | Exactitud respecto al control (%) | [Sulfato amónico] (mM) | Conc. (µg/mL) | CV (%) Conc. | Exactitud respecto al control (%) |
| 500 | 27.00 | 3.5 | <i>70.4</i> | 500 | 46.35 | 0.7 | <i>120.9</i> |
| 400 | 28.99 | 2.9 | <i>75.6</i> | 400 | 45.35 | 1.2 | <i>118.3</i> |
| 300 | 31.47 | 5.4 | <i>82.1</i> | 300 | 43.41 | 1.4 | <i>113.2</i> |
| 200 | 34.73 | 3.1 | <i>90.6</i> | 200 | 41.74 | 1.5 | <i>108.8</i> |
| 100 | 38.21 | 4.1 | <i>99.6</i> | 100 | 41.10 | 0.3 | <i>107.2</i> |
| 50 | 39.93 | 2.5 | <i>104.1</i> | 50 | 41.69 | 1.6 | <i>108.7</i> |
| 25 | 39.52 | 4.0 | <i>103.1</i> | 25 | 41.69 | 2.0 | <i>108.7</i> |
| [TrisHCl] pH 8 (mM) | Conc. (µg/mL) | CV (%) Conc. | Exactitud respecto al control (%) | [Acetato sódico] pH 5.5 (mM) | Conc. (µg/mL) | CV (%) Conc. | Exactitud respecto al control (%) |
| 100 | 39.88 | 3.7 | <i>104.0</i> | 100 | 36.95 | 1.9 | <i>95.5</i> |
| 50 | 39.07 | 5.4 | <i>101.9</i> | 50 | 35.96 | 1.6 | <i>92.9</i> |
| 20 | 40.47 | 2.2 | <i>105.5</i> | 20 | 34.55 | 4.5 | <i>89.3</i> |
| [Citratato sódico] pH 5.5 (mM) | Conc. (µg/mL) | CV (%) Conc. | Exactitud respecto al control (%) | [Carbonato sódico] pH 8 (mM) | Conc. (µg/mL) | CV (%) Conc. | Exactitud respecto al control (%) |
| 100 | 44.26 | 2.7 | <i>114.4</i> | 100 | 44.09 | 2.5 | <i>115.0</i> |
| 50 | 40.11 | 3.2 | <i>103.6</i> | 50 | 40.24 | 9.9 | <i>105.0</i> |
| 20 | 38.44 | 3.4 | <i>99.3</i> | 20 | 40.79 | 4.3 | <i>106.4</i> |
| [Fosfato sódico] pH 8 (mM) | Conc. (µg/mL) | CV (%) Conc. | Exactitud respecto al control (%) | Control | Conc. (mg/mL) | CV (%) | |
| 100 | 46.26 | 3.1 | <i>120.6</i> | QG31 en agua purificada | 38.34 | 3.7 | |
| 20 | 40.47 | 1.7 | <i>105.5</i> | | | | |

Se concluyó que el sulfato amónico (a partir de 500 mM), el cloruro sódico (a partir de 400 mM) y el fosfato sódico (a partir de 100 mM) afectaban más de un 20 % a la estimación de la cuantificación de proteína total por Bradford.

Conclusiones

El resumen de las especificaciones para la cuantificación de proteína total por Bradford se muestra en la Tabla 3.19.

Tabla 3.19. Especificaciones del método analítico "Cuantificación de proteína total por Bradford".

| METODO ANALÍTICO | RANGO LINEAL | LC (Límite de cuantificación) | LD (Límite de detección) | PRECISIÓN | EXACTITUD | CONCENTRACIONES DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN |
|------------------|--------------------|---|--------------------------|-----------|-----------|--|
| Bradford | 100 - 20 µg/mL BSA | 10 µg/mL BSA (exactitud y precisión: 75-125%) | 2.66 µg/mL BSA | 90-110 % | 90-110 % | 100, 80, 60, 40, 20 µg/mL BSA |

3.2.4. Cuantificación de QG31 mediante ELISA

Con la finalidad de medir el atributo de calidad de concentración de QG31, incluida en el parámetro de "Contenido", se empleó el método analítico ELISA (variante de doble fase, ver apartado "2.3.5. Cuantificación de QG31 por el método de ELISA doble fase"). Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-Phl p 5 seleccionado en el apartado "3.3.2. Western blot" para la recta patrón se empleó QG31 como proteína de referencia (apartado "3.2. Primera fase de desarrollo"). Los parámetros analizados para cualificar esta técnica se resumen en la Tabla 3.20.

Tabla 3.20. Parámetros para la cualificación del método analítico "Cuantificación de QG31 mediante ELISA".

| MÉTODOS ANALÍTICOS | PARÁMETRO DE ESPECIFICACIÓN | ATRIBUTO DE CALIDAD | PARÁMETROS DE CUALIFICACIÓN DE LA TÉCNICA | | | | | | |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------|---|----|------------|--------------|-----------|-----------|--------------|
| | | | LD | LC | Linealidad | Rango lineal | Precisión | Exactitud | Selectividad |
| ELISA QG31 | CONTENIDO | Concentración de QG31 | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |

Linealidad, rango lineal, límite de cuantificación (LC) y límite de detección (LD)

Se prepararon y analizaron 3 placas, en cada una de las cuales se incluyeron 12 concentraciones de QG31 (desde 10 000 hasta 4.88 ng/mL) por sextuplicado. El análisis de los resultados de exactitud, rango lineal, límite de cuantificación y límite de detección se muestra en la Tabla 3.21.

Tabla 3.21. Estudio del rango lineal, LC y LD en la cuantificación de QG31 mediante ELISA. Los valores en negrita indican los valores empleados para la recta de regresión obtenida al representar el promedio de la absorbancia a 492 nm (n=6) frente al logaritmo de la concentración de QG31.

| | [QG31] (ng/mL) | 10 000 | 5 000 | 2 500 | 1 250 | 625 | 312.5 | 156.25 | 78.13 | 39.06 | 19.53 | 9.77 | 4.88 | |
|---------|---|----------------|--------|-------|-----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------------|-------|-------|-------|------|
| | Log [QG31] | 4.0 | 3.7 | 3.4 | 3.1 | 2.8 | 2.5 | 2.2 | 1.9 | 1.6 | 1.3 | 0.99 | 0.69 | |
| PLACA 1 | Promedio Abs _{492nm} (n=6) | 4.263 | 4.123 | 4.172 | 4.069 | 3.650 | 2.716 | 1.723 | 0.983 | 0.555 | 0.290 | 0.159 | 0.094 | |
| | Exactitud (%) | 10.3 | 18.4 | 38.3 | 70.8 | 102.6 | 99.9 | 92.9 | 105.1 | 151.1 | 246.3 | 445.4 | 847.1 | |
| | Precisión (100 - CV) (%) | 97.5 | 99.2 | 99.2 | 99.2 | 98.3 | 94.1 | 96.2 | 93.4 | 93.9 | 90.8 | 89.8 | 80.3 | |
| | Rango lineal (cumple exactitud y precisión 80 - 120%): | - | - | - | - | √ | √ | √ | √ | - | - | - | - | |
| | Señal/ruido: | 118.4 | 114.5 | 115.9 | 113.0 | 101.4 | 75.4 | 47.9 | 27.3 | 15.4 | 8.0 | 4.4 | 2.6 | |
| | Recta regresión (625 a 78.13 µg/mL): | Pendiente: | 2.988 | | Ordenada en el origen | | | | -4.737 | R ² = 0.997 | | | | |
| | Límite de Cuantificación (menor valor con precisión y exactitud 75-125%): | | | | | | | | | 39.06 µg/mL | | | | |
| | Límite de Detección ([Señal/ (Ruido de los blancos)] > 2): | | | | | | | | | 4.88 µg/mL | | | | |
| | | [QG31] (ng/mL) | 10 000 | 5 000 | 2 500 | 1 250 | 625 | 312.5 | 156.25 | 78.13 | 39.06 | 19.53 | 9.77 | 4.88 |
| | | Log [QG31] | 4.0 | 3.7 | 3.4 | 3.1 | 2.8 | 2.5 | 2.2 | 1.9 | 1.6 | 1.3 | 0.99 | 0.69 |
| PLACA 2 | Promedio Abs _{492nm} (n=6) | 4.071 | 4.125 | 4.042 | 4.091 | 3.630 | 2.894 | 1.888 | 1.085 | 0.600 | 0.339 | 0.197 | 0.132 | |
| | Exactitud (%) | 8.6 | 18.0 | 33.7 | 70.0 | 96.8 | 107.3 | 95.8 | 100.5 | 136.3 | 221.1 | 394.5 | 749.2 | |
| | Precisión (100 - CV) (%) | 97.2 | 98.7 | 99.2 | 99.0 | 99.3 | 98.8 | 98.1 | 96.7 | 94.5 | 94.3 | 90.7 | 93.0 | |
| | Rango lineal (cumple exactitud y precisión 80 - 120%): | - | - | - | - | √ | √ | √ | √ | - | - | - | - | |
| | Señal/ruido: | 92.5 | 93.7 | 91.9 | 93.0 | 82.5 | 65.8 | 42.9 | 24.7 | 13.6 | 7.7 | 4.5 | 3.0 | |
| | Recta regresión (100 a 10 µg/mL): | Pendiente: | 2.871 | | Ordenada en el origen | | | | -4.356 | R ² = 0.997 | | | | |
| | Límite de Cuantificación (menor valor con precisión y exactitud 75-125%): | | | | | | | | | 78.13 µg/mL | | | | |
| | Límite de Detección ([Señal/ (Ruido de los blancos)] > 2): | | | | | | | | | 4.88 µg/mL | | | | |
| | | [QG31] (ng/mL) | 10 000 | 5 000 | 2 500 | 1 250 | 625 | 312.5 | 156.25 | 78.13 | 39.06 | 19.53 | 9.77 | 4.88 |
| | | Log [QG31] | 4.0 | 3.7 | 3.4 | 3.1 | 2.8 | 2.5 | 2.2 | 1.9 | 1.6 | 1.3 | 0.99 | 0.69 |
| PLACA 3 | Promedio Abs _{492nm} (n=6) | 3.949 | 3.856 | 3.882 | 3.906 | 3.711 | 2.907 | 1.849 | 1.098 | 0.599 | 0.316 | 0.173 | 0.109 | |
| | Exactitud (%) | 7.4 | 13.8 | 28.2 | 57.6 | 98.9 | 105.7 | 92.7 | 103.3 | 139.9 | 224.6 | 401.7 | 764.1 | |
| | Precisión (100 - CV) (%) | 98.3 | 98.4 | 98.1 | 97.5 | 99.5 | 99.0 | 97.8 | 96.7 | 97.0 | 95.1 | 92.9 | 91.5 | |
| | Rango lineal (cumple exactitud y precisión 80 - 120%): | - | - | - | - | √ | √ | √ | √ | - | - | - | - | |
| | Señal/ruido: | 112.8 | 110.2 | 110.9 | 111.6 | 106.0 | 83.0 | 52.8 | 31.4 | 17.1 | 9.0 | 4.9 | 3.1 | |
| | Recta regresión (100 a 10 µg/mL): | Pendiente: | 2.955 | | Ordenada en el origen | | | | -4.535 | R ² = 0.996 | | | | |
| | Límite de Cuantificación (menor valor con precisión y exactitud 75-125%): | | | | | | | | | 78.13 µg/mL | | | | |
| | Límite de Detección ([Señal/ (Ruido de los blancos)] > 2): | | | | | | | | | 4.88 µg/mL | | | | |

Teniendo en cuenta el peor caso de los resultados de las 3 placas ensayadas, se concluyó que:

- La exactitud de las concentraciones de QG31 entre 625 y 78.13 ng/mL (con valores entre 92.7 % y 105.7 % respecto al valor nominal) cumplían el criterio de aceptación 80-120 %.
- El *rango lineal*, fue desde 625 hasta 78.13 ng/mL QG31, cumpliendo el criterio de aceptación de exactitud 80-120 % y precisión 80-120 %.
- El *límite de detección* fue de 4.88 ng/mL QG31.
- El *límite de cuantificación* (utilizando el criterio del menor valor de la recta que cumpla 75-125 % para exactitud y precisión) fue de 78.13 ng/mL QG31.
- La recta comprendería los valores 625, 312.5, 156.25 y 78.13 ng/mL QG31 (rango lineal).

Precisión intraplaca e interplaca

La *precisión* se calculó intra e interplaca (Tabla 3.22) analizando el coeficiente de variación entre las medidas dentro de cada placa y entre las distintas placas del apartado anterior.

Tabla 3.22. Precisión intraplaca (tabla superior) e interplaca (tabla inferior) en la cuantificación de QG31 mediante ELISA.

| | | [QG31] (ng/mL) | | | | | | | | | | | |
|--------------------|---------------------------------------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 10 000 | 5 000 | 2 500 | 1 250 | 625 | 312.5 | 156.25 | 78.13 | 39.06 | 19.53 | 9.77 | 4.88 |
| PLACA 1 | Promedio Abs _{492nm} (n = 6) | 4.391 | 4.251 | 4.300 | 4.198 | 3.779 | 2.845 | 1.852 | 1.111 | 0.684 | 0.418 | 0.288 | 0.222 |
| | Desv. Est. | 0.108 | 0.035 | 0.032 | 0.031 | 0.064 | 0.161 | 0.065 | 0.064 | 0.034 | 0.027 | 0.016 | 0.018 |
| | CV (%) | 2.5 | 0.8 | 0.7 | 0.7 | 1.7 | 5.7 | 3.5 | 5.8 | 5.0 | 6.4 | 5.6 | 8.3 |
| PLACA 2 | Promedio Abs _{492nm} (n = 6) | 4.196 | 4.250 | 4.167 | 4.216 | 3.755 | 3.019 | 2.014 | 1.210 | 0.725 | 0.464 | 0.322 | 0.257 |
| | Desv. Est. | 0.113 | 0.053 | 0.033 | 0.042 | 0.027 | 0.034 | 0.037 | 0.036 | 0.033 | 0.019 | 0.018 | 0.009 |
| | CV (%) | 2.7 | 1.2 | 0.8 | 1.0 | 0.7 | 1.1 | 1.8 | 2.9 | 4.6 | 4.2 | 5.7 | 3.6 |
| PLACA 3 | Promedio Abs _{492nm} (n = 6) | 4.162 | 3.959 | 3.976 | 3.941 | 3.751 | 3.068 | 2.011 | 1.262 | 0.762 | 0.479 | 0.335 | 0.271 |
| | Desv. Est. | 0.029 | 0.036 | 0.044 | 0.054 | 0.019 | 0.026 | 0.041 | 0.036 | 0.019 | 0.015 | 0.012 | 0.009 |
| | CV (%) | 0.7 | 0.9 | 1.1 | 1.4 | 0.5 | 0.9 | 2.0 | 2.9 | 2.5 | 3.2 | 3.6 | 3.3 |
| PLACAS 1, 2 Y 3 | Promedio Abs _{492nm} (n = 3) | 4.250 | 4.153 | 4.148 | 4.118 | 3.762 | 2.977 | 1.959 | 1.194 | 0.723 | 0.454 | 0.315 | 0.250 |
| | Desv. Est. | 0.124 | 0.168 | 0.163 | 0.154 | 0.015 | 0.118 | 0.093 | 0.076 | 0.039 | 0.032 | 0.025 | 0.025 |
| | CV (%) | 2.9 | 4.0 | 3.9 | 3.7 | 0.4 | 3.9 | 4.7 | 6.4 | 5.4 | 7.0 | 7.8 | 10.1 |

Se pudo concluir que, en todas las concentraciones de QG31 ensayadas (desde 10 000 ng/mL hasta 4.88 ng/mL), la *precisión intraplaca* y la *precisión interplaca* fueron inferiores al 10 %, por lo que en ambos casos se cumplió el criterio de aceptación: CV < 20 %.

Repetibilidad

La *repetibilidad* se estudió realizando 6 lecturas de la placa 1 mencionada anteriormente. El coeficiente de variación en las 6 repeticiones consecutivas de la medida a 492 nm en todos los pocillos del experimento no superó el 3.1 %, por lo que cumplió el criterio de aceptación (CV < 10 %) (datos no mostrados).

Exactitud

La *exactitud* se midió:

- a) **por patrones**, cuantificando 3 concentraciones de QG31 (en las partes baja, media y alta de la recta, ver Tabla 3.23) por sextuplicado mediante la fórmula:

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{Conc. media determinada}}{\text{Conc. teórica}} \times 100$$

Tabla 3.23. Medida de la exactitud por patrones (cuantificación de QG31 mediante ELISA).

| [QG31] (ng/mL) | Conc. 1 (ng/mL) | Conc. 2 (ng/mL) | Conc. 3 (ng/mL) | Conc. 4 (ng/mL) | Conc. 5 (ng/mL) | Conc. 6 (ng/mL) | Promedio conc. (ng/mL) | CV (%) | Exactitud (%) |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------|--------|---------------|
| 75 | 79.07 | 77.25 | 76.25 | 75.99 | 74.95 | 79.75 | 77.21 | 2.42 | 102.95 |
| 300 | 333.98 | 303.55 | 317.49 | 309.81 | 303.80 | 296.20 | 310.80 | 4.31 | 103.60 |
| 600 | 590.50 | 596.31 | 586.18 | 591.46 | 588.09 | 564.57 | 586.19 | 1.90 | 97.70 |

- b) **por el método de adiciones y posterior estudio de las recuperaciones** (cuantificando una mezcla de QG31 más el patrón de QG31 empleado para la recta y calculando la recuperación, ver Tabla 3.24) mediante la fórmula:

$$\text{Exactitud (Recuperación)} = \frac{\text{Conc. (Muestra+Adicionada)} - \text{Conc. Muestra}}{\text{Conc. Adicionada}} \times 100$$

Tabla 3.24. Medida de la exactitud por el método de adiciones y posterior estudio de las recuperaciones (cuantificación de QG31 mediante ELISA).

| Muestra | Conc. 1 (µg/mL) | Conc. 2 (µg/mL) | Conc. 3 (µg/mL) | Conc. 4 (µg/mL) | Conc. 5 (µg/mL) | Conc. 6 (µg/mL) | Promedio conc. (ng/mL) | CV (%) | Exactitud (%) |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------------|--------|------------------|
| QG31 600 ng/mL | 0.483 | 0.412 | 0.481 | 0.421 | 0.423 | 0.476 | 0.449 | 7.56 | - |
| QG31 600 ng/mL + patrón 150 ng/mL | 0.608 | 0.547 | 0.599 | 0.602 | 0.565 | 0.550 | 0.579 | 4.80 | 86.11 |
| QG31 600 ng/mL + patrón 300 ng/mL | 0.743 | 0.728 | 0.665 | 0.736 | 0.640 | 0.660 | 0.696 | 6.52 | 82.04 |
| QG31 600 ng/mL + patrón 600 ng/mL | 0.936 | 0.966 | 0.926 | 0.920 | 0.998 | 0.891 | 0.940 | 3.99 | 81.70 |

Se pudo concluir que:

- la *exactitud* utilizando las concentraciones 75, 300 y 600 ng/mL fue de entre 97.7 % y 103.6 % (por lo que se situaba dentro del rango 90-110 %)

- la *exactitud* utilizando las adiciones del patrón QG31 150, 300 y 600 ng/mL sobre muestra de QG31 fue de entre 81.7 % y 86.11 %

En ambos casos se cumplió el criterio de aceptación 80-120 %.

Selectividad

Respecto a la *selectividad*, se identificaron los compuestos que potencialmente se podrían utilizar en el proceso de purificación de QG31 y se estudió el efecto de dichas matrices sobre la cuantificación de proteína total. Concretamente, se determinó el efecto de diferentes concentraciones de NaCl (en 2 mM Tris-HCl, pH 8); sulfato amónico (en 2 mM Tris-HCl, pH 8); Tris-HCl, pH 8; fosfato sódico, pH 8; carbonato sódico, pH 8; acetato sódico, pH 5.5 y citrato sódico, pH 5.5.

Se cuantificó por ELISA QG31 una muestra de QG31 a una concentración fija (240 µg/mL) preparada en diferentes concentraciones de las matrices mencionadas anteriormente.

Para cada valor experimental de concentración, asociado a una concentración determinada de diluyente, se calculó la exactitud respecto al control (QG31 diluida en PBS, Tween 0.05 %, BSA 1 %). Los resultados se muestran en la Tabla 3.25.

Tabla 3.25. Selectividad (efecto matriz) en la cuantificación de QG31 por ELISA. En cursiva se muestran los valores en los que la medida se vio afectada en más de un 20 %.

| | | | | | | | |
|-------------------------|-----------------------------------|------------------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| [NaCl] (mM) | Exactitud respecto al control (%) | [Sulfato amónico] (mM) | Exactitud respecto al control (%) | [TrisHCl] (mM) | Exactitud respecto al control (%) | [Fosfato sódico] (mM) | Exactitud respecto al control (%) |
| 500 | 93.5 | 500 | 165.2 | 100 | 64.4 | 100 | 92.4 |
| 400 | 87.1 | 400 | 121.9 | 80 | 61.9 | 80 | 84.4 |
| 300 | 86.7 | 300 | 106.0 | 50 | 63.0 | 50 | 83.1 |
| 200 | 92.2 | 200 | 91.6 | 20 | 72.8 | 40 | 86.0 |
| 100 | 94.6 | 100 | 88.8 | 10 | 80.6 | 10 | 88.1 |
| 50 | 95.7 | 50 | 85.5 | | | | |
| 25 | 100.0 | 25 | 91.6 | | | | |
| [Carbonato sódico] (mM) | Exactitud respecto al control (%) | [Citrato sódico] (mM) | Exactitud respecto al control (%) | [Acetato sódico] (mM) | Exactitud respecto al control (%) | | |
| 100 | 22.0 | 100 | 119.6 | 100 | 127.1 | | |
| 80 | 21.6 | 80 | 108.8 | 80 | 86.5 | | |
| 50 | 28.3 | 50 | 109.7 | 50 | 98.4 | | |
| 40 | 33.1 | 40 | 103.8 | 20 | 93.8 | | |
| 10 | 65.4 | 10 | 106.3 | 10 | 90.2 | | |

Se concluyó que las condiciones en las que la cuantificación de QG31 cumplió el criterio de aceptación de exactitud 80-120 % respecto al control (QG31 en PBS, Tween 0.05 %, BSA 1 %) fueron:

- 0 a 500 mM NaCl
- 0 a 300 mM sulfato amónico
- 0 a 10 mM Tris-HCl, pH 8
- 0 a 100 mM fosfato sódico, pH 8
- 0 a 80 mM acetato sódico, pH 5.5
- 0 a 100 mM citrato sódico, pH 5.5

En el caso del carbonato sódico pH 8, la primera medida a 10 mM afectaba ya a la cuantificación de QG31 en más de 20 %, y no cumplía el criterio de aceptación de exactitud 80-120 %.

Conclusiones

En base a los ensayos anteriores se establecieron las especificaciones que se resumen en la Tabla 3.26.

Tabla 3.26. Especificaciones del método analítico “Cuantificación de QG31 mediante ELISA”.

| METODO ANALÍTICO | ESPECIFICACIONES TÉCNICAS | RANGO LINEAL | LC (Limite de cuantificación) | LD (Limite de detección) | PRECISIÓN | EXACTITUD | CONCENTRACIONES DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN |
|------------------|---|------------------------|---|--------------------------|-----------|-----------|--|
| ELISA QG31 | Anticuerpo de captura: Anti Phl p 5 monoclonal 10B1 | 78.13 - 625 ng/mL QG31 | 78.13 ng/mL QG31 (75-125 % exactitud y precisión) | 4.88 ng/mL QG31 | 90-110 % | 80-120 % | 625, 312.5, 156.25 y 78.13 ng/mL QG31 |

3.2.5. Cromatografía analítica de tamizado molecular (SEC)

El método analítico de tamizado molecular (SEC, *Size exclusion Chromatography*) se empleó para analizar tanto la identidad (identificación por peso molecular) como la pureza (presencia o no de variantes de alto peso molecular) de QG31 en las diferentes muestras.

Los parámetros analizados para cualificar esta técnica se resumen en la Tabla 3.27.

Tabla 3.27. Parámetros para la cualificación del método analítico “Cromatografía SEC”.

| MÉTODO ANALÍTICO | PARÁMETRO DE ESPECIFICACIÓN | ATRIBUTO DE CALIDAD | ANÁLISIS PARA LA PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA | PARÁMETROS DE CUALIFICACIÓN DE LA TÉCNICA | | | | | | |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------------|--|---|----|------------|--------------|-----------|-----------|--------------|
| | | | | LD | LC | Linealidad | Rango lineal | Precisión | Exactitud | Selectividad |
| SEC | IDENTIDAD | Estructura primaria (peso molecular) | - Resolución de los marcadores de peso molecular y control interno (BSA) en la columna | √ | - | - | - | - | - | √ |
| | PUREZA / IMPUREZAS DE PRODUCTO | Variantes de alto peso molecular | | √ | √ | √ | √ | √ | √ | √ |

3.2.5.1. DESARROLLO DEL METODO SEC

Se utilizó la columna Bio SEC-5 para analizar la identidad y la pureza de QG31 mediante un análisis complementario al desarrollado mediante las técnicas de SDS-PAGE y Western blot. Se fijó el volumen a inyectar en 10 µL.

Se estudiaron los tiempos de retención de los picos del marcador de peso molecular “BEH200 SEC Protein Standard Mix” (Figura 3.21, panel izquierdo), para estudiar la capacidad de resolución de la columna. El tiempo de retención de la proteína BSA (Figura 3.21, panel derecho) fue utilizado como control interno en las series cromatográficas de análisis.

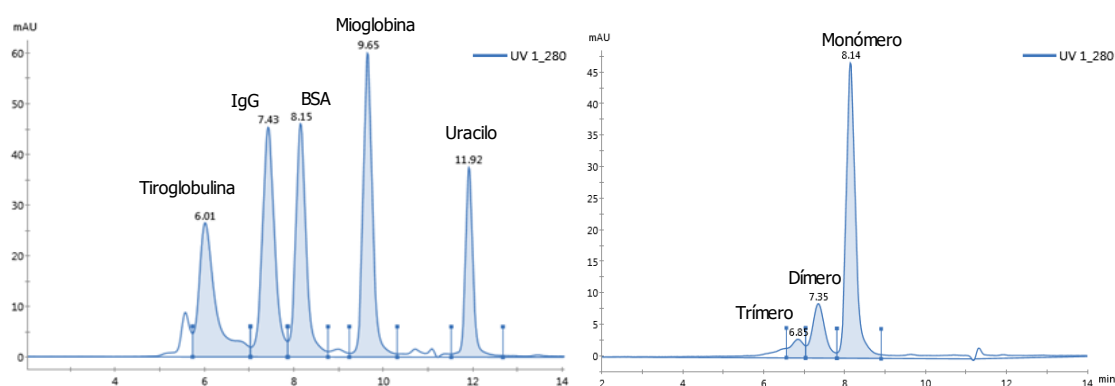


Figura 3.12. Perfil de elución en cromatografía analítica de tamizado molecular (SEC). Panel izquierdo: perfil de elución de los marcadores de peso molecular. Panel derecho: perfil de elución de la seroalbúmina bovina (BSA). En ambos casos se empleó la columna BioSEC-5 5 μm , 300 \AA , 7.8 x 300 mm, AGILENT, con la fase móvil 10 mM carbonato sódico, 0.9 % NaCl, pH 8.

Se comprobó que la columna era capaz de resolver todos los picos de los marcadores de peso molecular (resolución > 1.5, datos no mostrados). Antes de cada inyección de muestra en la columna, se cargaron tanto BSA como los marcadores de peso molecular, y se calculó el área y volumen de retención del pico monomérico del BSA y el tiempo de retención de los picos para comprobar el estado óptimo de la columna.

3.2.5.2. CUALIFICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE TAMIZADO MOLECULAR (SEC)

Linealidad, rango lineal, límite de cuantificación (LC)

Se analizaron distintas concentraciones de producto purificado de QG31 (desde 1 a 0.01 mg/mL por triplicado) empleando como fase móvil: 10 mM carbonato sódico, 0.9 % NaCl, pH 8 en la columna Bio SEC-5. A la concentración de 0.01 mg/mL no se detectó ningún pico.

En la Tabla 3.28 se muestran los valores de área del pico de QG31, exactitud y precisión en porcentaje para cada concentración de QG31.

Tabla 3.28. Estudio de la linealidad, rango lineal y LC en SEC. Los valores en negrita indican los valores empleados para la recta de regresión obtenida al representar el promedio del área del pico (n=3) frente a la concentración de QG31.

| | [QG31] (mg/mL) | | | | | | | |
|---|----------------|--------|-----------------------|--------------|--------------|-------|------------------|--------|
| | 0.025 | 0.050 | 0.075 | 0.10 | 0.25 | 0.50 | 0.75 | 1.0 |
| PROMEDIO Área (min · mAU) (n = 3) | 0.069 | 0.335 | 0.605 | 0.848 | 4.291 | 7.857 | 13.297 | 17.593 |
| Exactitud (%) | 219.5 | -108.6 | 93.8 | 117.7 | 87.0 | 106.6 | 97.9 | 100.2 |
| Precisión (100 - CV) (%) | 61.7 | 75.8 | 73.4 | 86.8 | 97.4 | 93.4 | 97.4 | 95.4 |
| Rango lineal (cumple exactitud y precisión 80 - 120%): | - | - | - | √ | √ | √ | √ | √ |
| Recta regresión (0.1 a 1 mg/mL QG31): | Pendiente: | 18.445 | Ordenada en el origen | | -0.8138 | | R ² = | 0.9964 |
| Límite de Cuantificación (menor valor con precisión y exactitud 75-125%): | 0.1 mg/mL | | | | | | | |

Se pudo concluir que:

- el área del pico era lineal en el rango: 0.1 – 1.0 mg/mL, donde cumplía el criterio de exactitud y precisión 80-120 %
- el límite de cuantificación (LC), donde la concentración más baja que cumplía el criterio de exactitud y precisión 75-125 %, fue 0.1 mg/mL

Exactitud

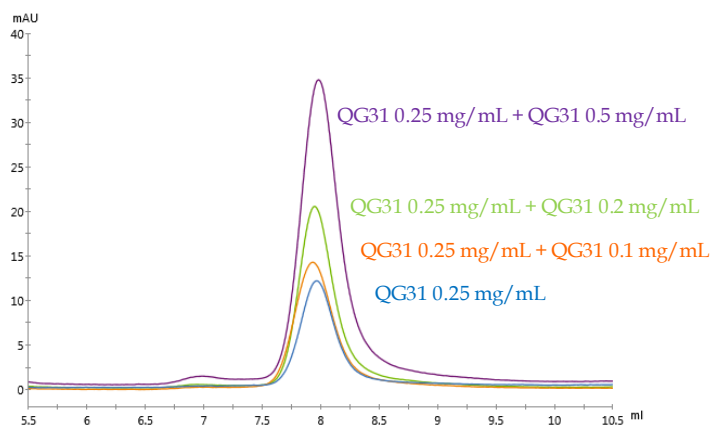
Se determinó la *exactitud* utilizando un método de adiciones y posterior estudio de las recuperaciones.

Se prepararon 4 muestras de QG31 a 0.25 mg/mL, a 3 de las cuales se les añadió diferentes cantidades del mismo producto (0.1, 0.25 y 0.5 mg/mL respectivamente). Cada muestra se analizó por duplicado. La fase móvil empleada fue 10 mM carbonato sódico, 0.9 % NaCl, pH 8.

A partir de la recta patrón calculada anteriormente (Tabla 3.28, $y=18.445x-0.814$), se calcularon las concentraciones de QG31 de la muestra de partida y las muestras suplementadas con concentraciones conocidas de QG31. A partir de estas concentraciones se calculó la exactitud según la siguiente fórmula:

$$\text{Exactitud (\%)} = \frac{\text{Conc. (Muestra+Adicionada)} - \text{Conc. Muestra}}{\text{Conc. Adicionada}} \times 100$$

En la Figura 3.22 se muestran los cromatogramas y se resumen los resultados del análisis de exactitud.



| MUESTRA | Área (min · mAU) | Promedio Área (min · mAU) | Desv. Est. Área (min · mAU) | CV (%) | [QG31] según recta patrón (mg/mL) | Exactitud (%) |
|--------------------------------------|------------------|---------------------------|-----------------------------|--------|-----------------------------------|---------------|
| QG31 (0.25 mg/ml) | 4.485 | 4.578 | 0.131 | 2.9 | 0.292 | - |
| | 4.670 | | | | | |
| QG31 (0.25 mg/ml) + QG31 (0.1 mg/mL) | 6.324 | 6.229 | 0.135 | 2.2 | 0.382 | 89.5 |
| | 6.133 | | | | | |
| QG31 (0.25 mg/ml) + QG31 (0.2 mg/mL) | 8.388 | 8.605 | 0.306 | 3.6 | 0.511 | 109.2 |
| | 8.821 | | | | | |
| QG31 (0.25 mg/ml) + QG31 (0.5 mg/mL) | 14.750 | 14.930 | 0.255 | 1.7 | 0.854 | 112.3 |
| | 15.110 | | | | | |

Figura 3.13. Medida de la exactitud por patrones (SEC). Panel superior: perfil de las cromatografías en columna Bio SEC-5. Panel inferior: cálculo de la exactitud a partir del área de los picos.

Se obtuvieron valores de exactitud de la cuantificación de QG31 mediante el método de las adiciones y posterior estudio de las recuperaciones entre 89.5 y 112.3 %, cumpliendo el criterio de aceptación 80-120 %.

Selectividad (variantes de alto peso molecular)

Con el objetivo de evaluar si el método analítico SEC era capaz de resolver los picos asociados a las variantes de peso molecular (respecto a la forma monomérica), se cromatografiaron muestras de la fase intermedia de purificación de QG31 (apartado “3.2.2. Purificación de QG31”, Figura 3.11) que contenían variantes de alto peso molecular.

Para ello se cargaron por sextuplicado tanto la muestra control (QG31 monomérica) como la muestra a analizar (QG31 con formas de alto peso molecular). Los resultados de estas analíticas se recogen en la Tabla 3.29.

Tabla 3.29. Estudio de la selectividad en el método analítico “SEC, cromatografía analítica de tamizado molecular” (n=6).

| | QG31 | |
|--|------------|----------------------------------|
| | Monomérico | Variantes de alto peso molecular |
| Promedio Tiempo de retención (t_R) (min) (n = 6) | 7.94 | 6.90 |
| CV (Tiempo de retención (t_R)) (%) | 0.14 | 0.53 |
| Promedio Área del pico (min · mAU) | 57.02 | 42.98 |
| CV (Área del pico) (%) | 3.96 | 5.26 |
| Resolución | 1.91 | |
| CV (Resolución) (%) | 1.17 | |

Se puede apreciar que el CV en todos los casos es inferior al 5 % para el tiempo de retención y la resolución y menor al 10 % para el área de los picos. Así mismo, se cumple el criterio de aceptación de resolución mayor de 1.5.

Selectividad (efecto matriz)

Se cargaron en la columna las disoluciones que se podrían emplear en el proceso de purificación de QG31 para comprobar si generaban picos en el cromatograma que pudieran distorsionar la medida del producto.

Se concluyó que los tampones: solución salina; PBS; 2 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8; 2 mM Tris-HCl, 500 mM sulfato amónico, pH 7; 200 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM carbonato sódico, 0.9 % NaCl, pH 8; 200 mM fosfato sódico, pH 8; 200 mM Tris-HCl, pH 8; 200 mM acetato sódico, pH 6 y 200 mM citrato sódico, pH 6 no generaron picos adicionales en la columna Bio SEC-5.

Conclusiones

En base a los ensayos anteriores se establecieron las especificaciones que se resumen en la Tabla 3.30.

Tabla 3.30. Especificaciones del método analítico “SEC, cromatografía analítica de tamizado molecular”.

| METODO ANALÍTICO | ESPECIFICACIONES TÉCNICAS | RANGO LINEAL | LC (Límite de cuantificación) | PRECISIÓN | EXACTITUD |
|------------------|---------------------------|-----------------|-------------------------------|-----------|-----------|
| SEC | 10 μ L Loop | 0.1 - 1.0 mg/mL | 0.1 mg/mL QG31 | 85-115% | 80-120% |

3.2.6. Cromatografía analítica de Fase reversa (RP)

La técnica analítica RP (*Reverse phase*) se desarrolló y cualificó para determinar las formas oxidadas de la proteína QG31 durante el proceso de producción y purificación.

Los parámetros analizados para cualificar esta técnica se resumen en la Tabla 3.31.

Tabla 3.31. Parámetros para la cualificación del método analítico "Fase reversa".

| MÉTODO ANALÍTICO | PARÁMETRO DE ESPECIFICACIÓN | ATRIBUTO DE CALIDAD | ANÁLISIS PARA LA PUESTA A PUNTO DE LA TÉCNICA | PARÁMETROS DE CUALIFICACIÓN DE LA TÉCNICA | | | | |
|-------------------|--------------------------------|---------------------|---|---|------------|--------------|-----------|--------------|
| | | | | LC | Linealidad | Rango lineal | Precisión | Selectividad |
| RP (Fase reversa) | PUREZA / IMPUREZAS DE PRODUCTO | Oxidación | - Desarrollo de un método cromatográfico capaz de discriminar las formas oxidadas de QG31 | √ | √ | √ | √ | √ |

3.2.6.1. DESARROLLO DEL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA

Empleando la columna ZORBAX 300SB-C18 (Agilent), se estudió qué método cromatográfico era capaz de resolver la forma oxidada de la forma no oxidada de QG31 y demostrar que la técnica cumplía el parámetro de selectividad. Para ello se estudiaron diferentes gradientes de elución.

Para oxidar las muestras de QG31 (producto purificado de QG31, ver apartado "3.2. Primera fase de desarrollo"), se empleó peróxido de hidrógeno. Se ensayaron distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno, distintos tiempos de incubación y distintos volúmenes de inyección de muestra en la columna de fase reversa.

Como tampón A se empleó 0.1 % de trifluoroacético en agua ultrapurificada y como tampón B 0.1 % de trifluoroacético en acetonitrilo.

El método cromatográfico se fue modificando mediante la adición de pasos de elución en gradiente y la modificación de la duración y pendiente de los mismos hasta elaborar el método cromatográfico más conveniente para separar las formas no oxidadas y oxidadas de QG31 (Tabla 3.32).

Tabla 3.32. Detalle de los métodos cromatográficos estudiados para la resolución de las formas oxidadas de QG31.

| Nº ensayo | Condiciones de incubación de la muestra (oxidación) | | Código del método cromatográfico | Volumen de inyección de muestra (µL) | Parámetros de los pasos (steps) del método cromatográfico | | | | | | | | |
|-----------|---|------------|----------------------------------|--------------------------------------|---|---------------|----------------|--------------------------------|---------------|----------------|--------------------------------|---------------|----------------|
| | % Peróxido de hidrógeno final | Tiempo (h) | | | Primer paso de elución | | | Segundo paso de elución | | | Tercer paso de elución | | |
| | | | | | Gradiente (%B inicial y final) | Duración (CV) | Relación %B/CV | Gradiente (%B inicial y final) | Duración (CV) | Relación %B/CV | Gradiente (%B inicial y final) | Duración (CV) | Relación %B/CV |
| 1 | 0 | 0.0 | RP1 | 10 | 0-100 % | 10 CV | 10 % / CV | - | - | - | - | - | - |
| 2 | 1 | 3.5 | RP1 | 10 | 0-100 % | 10 CV | 10 % / CV | - | - | - | - | - | - |
| 3 | 0.1 | 24 | RP1 | 10 | 0-100 % | 10 CV | 10 % / CV | - | - | - | - | - | - |
| 4 | 1 | 24 | RP1 | 10 | 0-100 % | 10 CV | 10 % / CV | - | - | - | - | - | - |
| 5 | 0 | 24 | RP1 | 10 | 0-100 % | 10 CV | 10 % / CV | - | - | - | - | - | - |
| 6 | 0 | 0 | RP2 | 10 | 0-45 % | 2.25 CV | 20 % / CV | 45-75 % | 7.5 CV | 4 % / CV | 75-100 % | 1.25 CV | 20 % / CV |
| 7 | 0 | 0 | RP3 | 10 | 0-30 % | 1.5 CV | 20 % / CV | 30-75 % | 11.25 CV | 4 % / CV | 75-100 % | 1.25 CV | 20 % / CV |
| 8 | 0 | 24 | RP3 | 10 | 0-30 % | 1.5 CV | 20 % / CV | 30-75 % | 11.25 CV | 4 % / CV | 75-100 % | 1.25 CV | 20 % / CV |
| 9 | 0.1 | 4 | RP3 | 10 | 0-30 % | 1.5 CV | 20 % / CV | 30-75 % | 11.25 CV | 4 % / CV | 75-100 % | 1.25 CV | 20 % / CV |
| 10 | 0.1 | 24 | RP3 | 10 | 0-30 % | 1.5 CV | 20 % / CV | 30-75 % | 11.25 CV | 4 % / CV | 75-100 % | 1.25 CV | 20 % / CV |
| 11 | 0.50 | 2 | RP3 | 10 | 0-30 % | 1.5 CV | 20 % / CV | 30-75 % | 11.25 CV | 4 % / CV | 75-100 % | 1.25 CV | 20 % / CV |
| 12 | 0.25 | 2 | RP3 | 10 | 0-30 % | 1.5 CV | 20 % / CV | 30-75 % | 11.25 CV | 4 % / CV | 75-100 % | 1.25 CV | 20 % / CV |
| 13 | 0.75 | 2 | RP3 | 10 | 0-30 % | 1.5 CV | 20 % / CV | 30-75 % | 11.25 CV | 4 % / CV | 75-100 % | 1.25 CV | 20 % / CV |
| 14 | 1 | 2 | RP3 | 10 | 0-30 % | 1.5 CV | 20 % / CV | 30-75 % | 11.25 CV | 4 % / CV | 75-100 % | 1.25 CV | 20 % / CV |
| 15 | 0.5 | 2 | RP4 | 20 | 0-30 % | 1.5 CV | 20 % / CV | 30-60 % | 30 CV | 1 % / CV | 60-100 % | 2 CV | 20 % / CV |
| 16 | 0 | 0 | RP4 | 20 | 0-30 % | 1.5 CV | 20 % / CV | 30-60 % | 30 CV | 1 % / CV | 60-100 % | 2 CV | 20 % / CV |
| 17 | 1 | 2 | RP5 | 20 | 0-35 % | 1.75 CV | 20 % / CV | 35-50 % | 15 CV | 1 % / CV | 50-100 % | 2.5 CV | 20 % / CV |
| 18 | 1 | 24 | RP6 | 100 | 0-39 % | 1.95 CV | 20 % / CV | 39-45 % | 24 CV | 0.25 % / CV | 45-100 % | 2.75 CV | 20 % / CV |
| 19 | 1 | 2 | RP7 | 100 | 0-35 % | 1.75 CV | 20 % / CV | 35-45 % | 40 CV | 0.25 % / CV | 45-100 % | 2.75 CV | 20 % / CV |
| 20 | 1 | 2 | RP8 | 20 | 0-30 % | 1.5 CV | 20 % / CV | 30-45 % | 30 CV | 0.5 % / CV | 45-100 % | 2.75 CV | 20 % / CV |
| 21 | 1 | 2 | RP9 | 20 | 0-37 % | 1.85 CV | 20 % / CV | 37-45 % | 16 CV | 0.5 % / CV | 45-100 % | 2.75 CV | 20 % / CV |
| 22 | 0 | 0 | RP9 | 20 | 0-37 % | 1.85 CV | 20 % / CV | 37-45 % | 16 CV | 0.5 % / CV | 45-100 % | 2.75 CV | 20 % / CV |
| 23 | 1 | 1 | RP10 | 20 | 0-37 % | 1.85 CV | 20 % / CV | 37-45 % | 8 CV | 1 % / CV | 45-100 % | 2.75 CV | 20 % / CV |

Se analizó la aparición de picos adicionales, o de hombros en los picos, la resolución y altura de los picos, para evaluar la idoneidad del método cromatográfico (datos no mostrados).

El método desarrollado que se fijó finalmente constó de 3 pasos (o *steps*) de elución (Tabla 3.33) donde QG31 eluía en el segundo paso de elución.

Tabla 3.33. Descripción del método de cromatografía de fase reversa para la separación de las formas oxidadas de QG31.

| Primer paso de elución | | | Segundo paso de elución | | | Tercer paso de elución | | |
|------------------------|---------------|----------------|-------------------------|---------------|----------------|------------------------|---------------|----------------|
| Gradiente (%B) | Duración (CV) | Relación %B/CV | Gradiente (%B) | Duración (CV) | Relación %B/CV | Gradiente (%B) | Duración (CV) | Relación %B/CV |
| 0-37 % | 1.85 CV | 20 % B / CV | 37-45 % | 8 CV | 1 % B / CV | 45-100 % | 2.75 CV | 20 % B / CV |

Se observó que el método era capaz de resolver los picos correspondientes a ambas formas de oxidación con resolución > 1.5, tal y como se observa en la Figura 3.23.

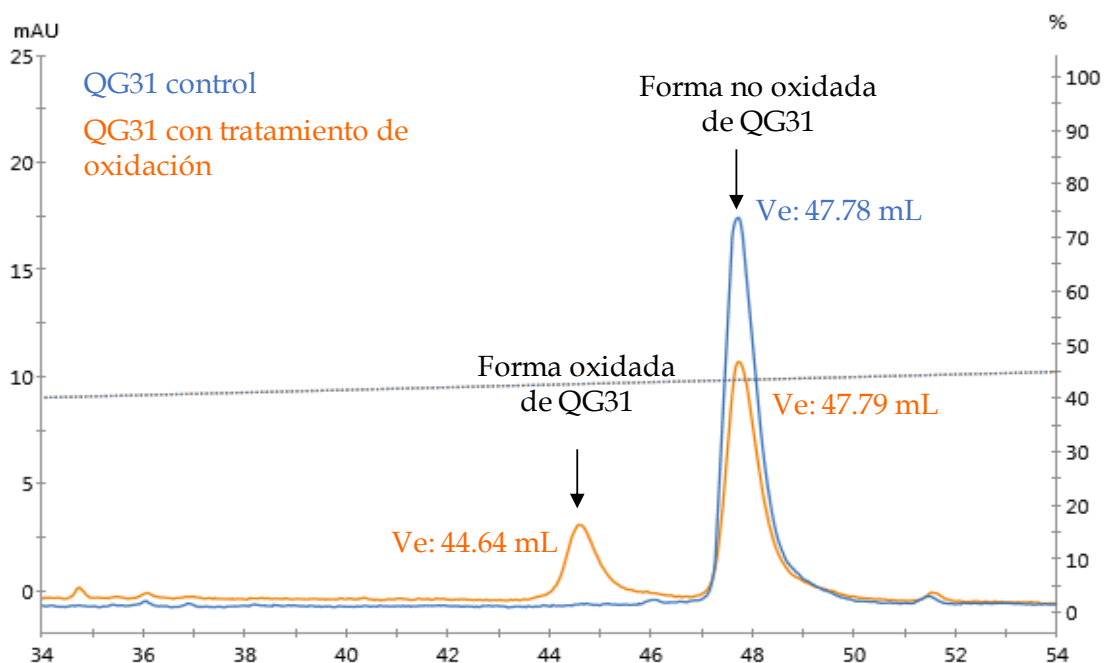


Figura 3.14. Perfil de elución en cromatografía de fase reversa para la separación de formas oxidadas de QG31. En el eje de ordenadas se representa la absorbancia (mAU) en el eje izquierdo y el % B en el eje derecho. En el eje de abscisas se representa el volumen de elución (mL). Columna: ZORBAX 300SB-C18 (Agilent). Tampón A: 0.1 % de trifluoroacético en agua ultrapurificada. Tampón B: 0.1 % de trifluoroacético en acetonitrilo.

3.2.6.2. CUALIFICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA DE FASE REVERSA

Linealidad, rango lineal, límite de cuantificación (LC)

Para estudiar la *linealidad*, el *rango lineal* y el *límite de cuantificación* (LC), se aplicaron en la columna ZORBAX diferentes concentraciones de QG31 (desde 0.025 hasta 0.5 mg/mL) y se eluyeron con el método cromatográfico establecido en el apartado anterior (Tabla 3.33).

En la Tabla 3.34 se muestran los valores de área del pico de QG31, exactitud y precisión en porcentaje para cada concentración de QG31.

Tabla 3.34. Estudio de la linealidad, rango lineal y LC en fase reversa. Los valores en negrita indican los valores empleados para la recta de regresión obtenida al representar el promedio del área del pico (n=3) frente a la concentración de QG31.

| | [QG31] (mg/mL) | | | | | | | |
|---|----------------|---------------|------------------------|--------------|--------------|------------------|-------------|--------|
| | 0.5 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.1 | 0.075 | 0.050 | 0.025 |
| PROMEDIO Área (min · mAU) (n = 3) | 13.917 | 11.520 | 8.126 | 4.988 | 2.422 | 1.373 | 0.998 | 0.254 |
| Exactitud (%) | 101.5 | 96.7 | 100.6 | 104.0 | 91.0 | 107.1 | 64.1 | 2791.1 |
| Precisión (100 - CV) (%) | 93.5 | 96.3 | 93.0 | 94.0 | 89.9 | 91.7 | 96.1 | 86.9 |
| Rango lineal (cumple exactitud y precisión 80 - 120%): | √ | √ | √ | √ | √ | √ | - | - |
| Recta regresión (0.075 a 0.5 mg/mL QG31): | Pendiente: | 29.757 | Ordenada en el origen: | -0.754 | | R ² = | 0.998 | |
| Límite de Cuantificación (menor valor con precisión y exactitud 75-125%): | | | | | | | 0.075 µg/mL | |

El promedio del tiempo de retención del pico de QG31 analizado en todos los cromatogramas (n = 24) fue de 48.002 min (con una desviación estándar de 0.42 y un coeficiente de variación de 0.88 %).

De todos estos resultados se dedujo que, entre 0.075 y 0.5 mg/mL QG31:

- La *exactitud* de las concentraciones de QG31, con valores entre 91.0 % y 107.1 % respecto al valor nominal, cumplía el criterio de aceptación 80-120 %.
- La *precisión* de las concentraciones de QG31, con valores entre 96.3 % y 86.9 % respecto al valor nominal, cumplía el criterio de aceptación 85-115 %.
- El área del pico de QG31 era lineal con exactitud 80-120 % y precisión 85-115 %.
- El *límite de cuantificación* (LC) (concentración más baja que cumplió el criterio de exactitud 85-125 % y precisión 75-125 %) fue de 0.075 mg/mL.

Resolución, precisión

La *resolución* y la *precisión* se estudiaron analizando los cromatogramas al aplicar QG31 sin oxidar y QG31 oxidado.

Tabla 3.35. Análisis de la precisión y la resolución de las formas oxidada y no oxidada de QG31 en fase reversa.

| | QG31 | | | | |
|------------------|----------------------|-----------------|------------|----------------------|-----------------|
| | Forma sin oxidar | | | Forma oxidada | |
| | t _R (min) | % Área relativa | Resolución | t _R (min) | % Área relativa |
| Cromatograma n°1 | 48.00 | 77.22 | 2.68 | 44.35 | 22.78 |
| Cromatograma n°2 | 47.85 | 76.14 | 2.58 | 44.22 | 23.86 |
| Cromatograma n°3 | 47.82 | 76.64 | 2.54 | 44.34 | 23.36 |
| Cromatograma n°4 | 47.59 | 78.57 | 2.66 | 44.15 | 21.43 |
| Cromatograma n°5 | 47.78 | 76.62 | 2.65 | 44.64 | 23.38 |
| Cromatograma n°6 | 47.92 | 76.18 | 2.99 | 44.74 | 23.82 |
| <i>Promedio</i> | 47.83 | 76.90 | 2.68 | 44.40 | 23.10 |
| <i>CV</i> | 0.29 | 1.18 | 5.94 | 0.53 | 3.93 |

Se concluyó que:

- Para el parámetro "tiempo de retención", se cumplió el criterio de aceptación de CV < 5 %.
- Para el parámetro "porcentaje de área" (CV entre 1.18 y 3.93 %) se cumplió el criterio de aceptación de CV < 5 %.
- El promedio de la resolución de la forma no oxidada respecto a la oxidada fue de 2.68 (CV = 5.94 %), por lo que cumple el criterio de aceptación de resolución ≥ 1.5.

Selectividad (efecto matriz)

Se estudió si se observaba un cambio en el perfil cromatográfico de QG31 al aplicar distintos tampones en la columna ZORBAX 300SB-C18. Como en las técnicas anteriores, se estudiaron los compuestos que potencialmente se podrían utilizar en el proceso de purificación de QG31.

Se concluyó que el tampón 200 mM acetato sódico pH 6 generaba un pico con un tiempo de retención de 46.1 min en fase reversa que coincidía con la forma oxidada de QG31, pero solamente de un área de 0.07 min*mAU.

Los tampones 10 mM carbonato sódico, 0.9 % NaCl, pH 8; 200 mM fosfato sódico, pH 8; 200 mM acetato sódico, pH 6; 200 mM citrato sódico, pH 6 generaban un pico con un tiempo de retención de 49.5-49.7 min en fase reversa que coincidían con la forma no oxidada de QG31, pero de un área inferior a 0.09 min*mAU.

Conclusiones

En base a los ensayos anteriores se establecieron las especificaciones que se resumen en la Tabla 3.36.

Tabla 3.36. Especificaciones del método analítico "cromatografía en fase reversa".

| METODO ANALÍTICO | ESPECIFICACIONES TÉCNICAS | RANGO LINEAL | LC (Límite de cuantificación) | PRECISIÓN | EXACTITUD |
|-------------------|---------------------------|------------------------|---|-----------|-----------|
| RP (Fase reversa) | 20 µL Loop | 0.075 - 0.5 mg/mL QG31 | a) 0.075 mg/mL QG31 (exactitud: 85-125%; precisión:75-125%) b) 0.05 mg/mL (S/N>10) | 85-115% | 80-120% |

3.2.7. Cuantificación de endotoxinas (LAL)

Como ya se comentó en el apartado "Materiales y métodos", las endotoxinas son lipopolisacáridos que se localizan en la membrana externa de las bacterias gram negativas y que son un estimulante del sistema inmune, con un potente efecto tóxico.

Con el objetivo de evaluar la presencia de endotoxinas en las muestras de proceso (como control de las impurezas de proceso) se aplicó el método analítico de "cuantificación de endotoxinas" mediante el kit "Limulus Amebocyte Lysate kit".

Los parámetros analizados para cualificar esta técnica se resumen en la Tabla 3.37.

Tabla 3.37. Parámetros para la cualificación del método analítico "Cuantificación de endotoxinas (LAL)".

| MÉTODO ANALÍTICO | PARÁMETRO DE ESPECIFICACIÓN | ATRIBUTO DE CALIDAD | PARÁMETROS DE CUALIFICACIÓN DE LA TÉCNICA | | | | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------|---|------------|--------------|-----------|-----------|--------------|
| | | | LC | Linealidad | Rango lineal | Precisión | Exactitud | Selectividad |
| CUANTIFICACIÓN DE ENDOTOXINAS (LAL) | IMPUREZAS DE PROCESO | Endotoxinas | √ | √ | √ | √ | √ | √ |

Linealidad, rango lineal, límite de cuantificación (LC)

Se analizaron 3 placas en las que se cuantificaron 5 rectas patrón en cada placa que incluían las concentraciones de 1, 0.5, 0.25, 0.1 y 0 EU/mL (unidades de endotoxinas por mL) (Tabla 3.38).

Tabla 3.38. Estudio de la linealidad, rango lineal y LC en la cuantificación de endotoxinas. Los valores en **negrita** indican los valores empleados para la recta de regresión obtenida al representar el promedio de la absorbancia a 405 nm (n=5) frente a la concentración de QG31.

| | | [Endotoxinas] (EU/mL) | | | |
|---------|---|-------------------------|-------------------------------|------------------|--------------|
| | | 1.0 | 0.5 | 0.25 | 0.1 |
| PLACA 1 | Promedio Abs _{405nm} (n = 5) | 1.419 | 0.733 | 0.243 | 0.049 |
| | Exactitud (%) | 98.6 | 108.3 | 89.7 | 98.5 |
| | Precisión (100 - CV) (%) | 98.7 | 96.7 | 94.5 | 93.4 |
| | Rango lineal (cumple exactitud y precisión 80 - 120%): | √ | √ | √ | √ |
| | Recta regresión (1 a 0.1 EU/mL): | Pendiente: 1.544 | Ordenada en el origen: -0.103 | R ² = | 0.994 |
| | Límite de Cuantificación (menor valor con precisión y exactitud 75-125%): | 0.1 µg/mL | | | |
| | | [Endotoxinas] (EU/mL) | | | |
| | | 1.0 | 0.5 | 0.25 | 0.1 |
| PLACA 2 | Promedio Abs _{405nm} (n = 5) | 1.453 | 0.809 | 0.336 | 0.094 |
| | Exactitud (%) | 97.8 | 110.5 | 95.8 | 79.6 |
| | Precisión (100 - CV) (%) | 96.7 | 97.2 | 93.3 | 90.7 |
| | Rango lineal (cumple exactitud y precisión 80 - 120%): | √ | √ | √ | √ |
| | Recta regresión (1 a 0.1 EU/mL): | Pendiente: 1.511 | Ordenada en el origen: -0.026 | R ² = | 0.992 |
| | Límite de Cuantificación (menor valor con precisión y exactitud 75-125%): | 0.1 µg/mL | | | |
| | | [Endotoxinas] (EU/mL) | | | |
| | | 1.0 | 0.5 | 0.25 | 0.1 |
| PLACA 3 | Promedio Abs _{405nm} (n = 5) | 1.218 | 0.585 | 0.185 | 0.043 |
| | Exactitud (%) | 99.6 | 104.1 | 88.0 | 113.5 |
| | Precisión (100 - CV) (%) | 97.2 | 94.9 | 84.6 | 91.1 |
| | Rango lineal (cumple exactitud y precisión 80 - 120%): | √ | √ | √ | √ |
| | Recta regresión (1 a 0.1 EU/mL): | Pendiente: 1.331 | Ordenada en el origen: -0.108 | R ² = | 0.997 |
| | Límite de Cuantificación (menor valor con precisión y exactitud 75-125%): | 0.1 µg/mL | | | |

De estos ensayos se pudo concluir que:

- El *rango lineal* que englobaba 1.0, 0.5, 0.25 y 0.1 EU/mL cumplió el criterio de aceptación de exactitud 80-120 % y precisión 80-120 %.
- El *límite de cuantificación*, teniendo en cuenta el peor caso de los resultados de las 3 placas ensayadas, fue de 0.1 EU/mL, utilizando el criterio del menor valor de la recta que cumpliera 75-125 % para exactitud y precisión.
- La *recta* comprendía los valores 1, 0.5, 0.25, 0.1 EU/mL.

Precisión intraplaca e interplaca

La *precisión* se calculó intra e interplaca (Tabla 3.39) analizando el coeficiente de variación entre las medidas dentro de cada placa y entre las distintas placas del apartado anterior.

Tabla 3.39. Precisión intraplaca (tabla superior) e interplaca (tabla inferior) en la cuantificación de endotoxinas.

| | | [Endotoxinas] (EU/mL) | | | |
|-----------------|---|-----------------------|-------|-------|-------|
| | | 1.0 | 0.5 | 0.25 | 0.1 |
| PLACA 1 | Promedio Abs _{405nm} (n = 5) | 1.419 | 0.733 | 0.243 | 0.049 |
| | Desv. Est. | 0.018 | 0.024 | 0.013 | 0.003 |
| | CV (%) | 1.3 | 3.3 | 5.5 | 6.6 |
| PLACA 2 | Promedio Abs _{405nm} (n = 5) | 1.453 | 0.809 | 0.336 | 0.094 |
| | Desv. Est. | 0.048 | 0.023 | 0.022 | 0.009 |
| | CV (%) | 3.3 | 2.8 | 6.7 | 9.3 |
| PLACA 3 | Promedio Abs _{405nm} (n = 5) | 1.218 | 0.585 | 0.185 | 0.043 |
| | Desv. Est. | 0.034 | 0.030 | 0.028 | 0.004 |
| | CV (%) | 2.8 | 5.1 | 15.4 | 8.9 |
| PLACAS 1, 2 Y 3 | Promedio Abs _{405nm} (interplaca, n=3) | 1.363 | 0.709 | 0.255 | 0.062 |
| | Desv. Est. | 0.127 | 0.114 | 0.076 | 0.028 |
| | CV (%) | 9.3 | 16.1 | 29.9 | 45.2 |

En este apartado se concluyó que:

- La *precisión intraplaca* fue inferior al 15.4 % en todas las concentraciones de endotoxinas ensayadas (1, 0.5, 0.25, 0.1 EU/mL), por lo que cumplió el criterio de aceptación (CV<20 %).
- La *precisión interplaca* fue superior al 20 % en las concentraciones de endotoxinas 0.1 y 0.25 EU/mL, por lo que no cumplió el criterio de aceptación (CV<20 %).

Repetibilidad

La *repetibilidad* se estudió realizando 6 lecturas de la placa 1 mencionada anteriormente. El coeficiente de variación en las 6 repeticiones consecutivas de la medida a 405 nm en todos los pocillos del experimento no superó el 1.1 %, por lo que cumplió el criterio de aceptación (<10 %) (datos no mostrados).

Exactitud

La *exactitud* se midió por patrones, cuantificando 2 concentraciones de endotoxinas, 0.75 EU/mL y 0.4 EU/mL por sextuplicado (Tabla 3.40), mediante la fórmula:

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{Conc. media determinada}}{\text{Conc. teórica}} \times 100$$

Tabla 3.40. Medida de la exactitud por patrones (cuantificación de endotoxinas).

| [Endotoxinas] (EU/mL) | Conc. 1 (EU/mL) | Conc. 2 (EU/mL) | Conc. 3 (EU/mL) | Conc. 4 (EU/mL) | Conc. 5 (EU/mL) | Conc. 6 (EU/mL) | Promedio conc. (EU/mL) | CV (%) | Exactitud (%) |
|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------------|--------|------------------|
| 0.75 | 0.79 | 0.75 | 0.77 | 0.78 | 0.74 | 0.75 | 0.76 | 2.30 | 101.55 |
| 0.4 | 0.43 | 0.42 | 0.41 | 0.40 | 0.36 | 0.39 | 0.40 | 6.37 | 100.61 |

Se concluyó que para la *exactitud* utilizando patrón de 0.75 y 0.4 EU/mL se obtuvieron valores de 100.6 % y 101.6 %, por lo que cumplía el criterio de aceptación (80-120 %).

Selectividad (efecto matriz)

Se identificaron los compuestos que potencialmente se podrían utilizar en el proceso de purificación de QG31 y se estudió el efecto de dichas matrices sobre la cuantificación de proteína total. Concretamente, se determinó el efecto de diferentes concentraciones de NaCl (en 2 mM Tris-HCl, pH8); sulfato amónico (en 2 mM Tris-HCl, pH8); Tris-HCl, pH 8; fosfato sódico, pH 8; carbonato sódico, pH 8; acetato sódico, pH 6 y citrato sódico, pH 6.

Se cuantificó una muestra de endotoxinas a una concentración fija (0.4 EU/mL) preparada en diferentes concentraciones de las matrices mencionadas anteriormente (ver Tabla 3.41).

Tabla 3.41. Efecto matriz (selectividad) en la cuantificación de endotoxinas. En cursiva se muestran los valores en los que la medida se veía afectada en más de un 20 %.

| [NaCl] (mM) | [Endotoxinas] (EU/mL) | CV (%) Conc. | Exactitud respecto al control (%) |
|-------------|-----------------------|--------------|-----------------------------------|
| 500 | 0.04 | 1.1 | 9.7 |
| 400 | 0.04 | 3.0 | 9.2 |
| 300 | 0.05 | 4.8 | 13.2 |
| 200 | 0.13 | 3.8 | 31.8 |
| 100 | 0.30 | 4.8 | 74.8 |
| 50 | 0.35 | 8.7 | 87.0 |
| 25 | 0.37 | 9.7 | 93.0 |

| [Sulfato amónico] (mM) | [Endotoxinas] (EU/mL) | CV (%) Conc. | Exactitud respecto al control (%) |
|------------------------|-----------------------|--------------|-----------------------------------|
| 500 | 0.04 | 86.6 | 8.9 |
| 400 | 0.02 | 173.2 | 4.4 |
| 300 | 0.00 | - | - |
| 200 | 0.02 | 173.2 | 4.4 |
| 100 | 0.00 | - | - |
| 50 | 0.00 | - | - |
| 25 | 0.06 | 4.0 | 14.1 |

| [TrisHCl] pH 8 (mM) | [Endotoxinas] (EU/mL) | CV (%) Conc. | Exactitud respecto al control (%) |
|---------------------|-----------------------|--------------|-----------------------------------|
| 100 | 0.23 | 1.7 | 56.6 |
| 50 | 0.31 | 4.2 | 78.3 |
| 20 | 0.40 | 2.7 | 101.1 |

| [Acetato sódico] pH 5.5 (mM) | [Endotoxinas] (EU/mL) | CV (%) Conc. | Exactitud respecto al control (%) |
|------------------------------|-----------------------|--------------|-----------------------------------|
| 100 | 0.36 | 2.1 | 89.6 |
| 50 | 0.39 | 3.9 | 96.8 |
| 20 | 0.38 | 7.7 | 94.3 |

| [Citrato sódico] pH 6 (mM) | [Endotoxinas] (EU/mL) | CV (%) Conc. | Exactitud respecto al control (%) |
|----------------------------|-----------------------|--------------|-----------------------------------|
| 100 | 0.00 | 0.0 | - |
| 50 | 0.00 | 0.0 | - |
| 20 | 0.00 | 0.0 | - |

| [Carbonato sódico] pH 8 (mM) | [Endotoxinas] (EU/mL) | CV (%) Conc. | Exactitud respecto al control (%) |
|------------------------------|-----------------------|--------------|-----------------------------------|
| 100 | 0.12 | 2.1 | 29.4 |
| 50 | 0.26 | 6.5 | 65.7 |
| 20 | 0.42 | 2.1 | 106.2 |

| [Fosfato sódico] pH 8 (mM) | [Endotoxinas] (EU/mL) | CV (%) Conc. | Exactitud respecto al control (%) |
|----------------------------|-----------------------|--------------|-----------------------------------|
| 100 | 0.00 | - | 18.9 |
| 50 | 0.05 | 86.6 | 19.1 |
| 20 | 0.15 | 3.4 | 38.5 |

De estos análisis se pudo concluir que:

- El acetato sódico no afectó más de un 20 % a la cuantificación de endotoxinas en ninguna de las concentraciones analizadas.
- El Tris, pH 8 y carbonato sódico, pH 8 afectaron más de un 20 % a partir de 20 mM.
- El resto de soluciones: NaCl (en 2 mM Tris-HCl, pH 8); sulfato amónico (en 2 mM Tris-HCl, pH 8); fosfato sódico, pH 8; carbonato sódico, pH 8; y citrato sódico, pH 6 afectaron más de un 20 % en todas las concentraciones estudiadas.

Conclusiones

En base a los ensayos anteriores se establecieron las especificaciones que se resumen en la Tabla 3.42.

Tabla 3.42. Especificaciones del método analítico "Cuantificación de endotoxinas".

| METODO ANALÍTICO | RANGO LINEAL | LC (Límite de cuantificación) | PRECISIÓN | EXACTITUD | CONCENTRACIONES DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN |
|------------------|---------------|-------------------------------|----------------------------|-----------|--|
| LAL | 0.1 - 1 EU/mL | 0.1 EU/mL endotoxin | 80-120 % (solo intraplaca) | 80-120 % | 1, 0.5, 0.25, 0.1 EU/mL |

3.2.8. Cuantificación de HCPs

Como ya se comentó en el apartado de Materiales y métodos, el kit de cuantificación de HCPs (*Host Cell Proteins*, proteínas de la célula hospedadora) está desarrollado para determinar la presencia de HCPs de *E. coli* en productos producidos en *E. coli*. Es un método genérico, es decir, está diseñado para reaccionar con todas las HCP que puedan contaminar el producto independientemente del proceso de purificación.

En esta técnica, la absorbancia a 405 nm es directamente proporcional a la concentración de HCPs presentes mediante un modelo logístico de 4 parámetros (4 PL) aplicando la fórmula:

$$y = d + \frac{a - d}{1 + \left(\frac{x}{c}\right)^b}$$

donde:

- *a* es el mínimo valor que se puede obtener
- *b* es la pendiente de la curva, pendiente de Hill
- *c* es el punto de inflexión (punto medio de la curva entre los valores *a* y *d*)
- *d* es el máximo valor que se puede obtener
- *y* es la absorbancia a 405 nm
- *x* es la concentración de HCPs.

Los parámetros analizados para cualificar esta técnica se resumen en la Tabla 3.43.

Tabla 3.43. Parámetros para la cualificación del método analítico “Cuantificación de HCPs”.

| MÉTODO ANALÍTICO | PARÁMETRO DE ESPECIFICACIÓN | ATRIBUTO DE CALIDAD | PARÁMETROS DE CUALIFICACIÓN DE LA TÉCNICA | | | | | |
|------------------|-----------------------------|--|---|------------|--------------|-----------|-----------|--------------|
| | | | LC | Linealidad | Rango lineal | Precisión | Exactitud | Selectividad |
| HCPs | IMPUREZAS DE PROCESO | Proteínas de la célula hospedadora (Host cell proteins (HCPs)) | √ | √ | √ | √ | √ | √ |

Linealidad, rango lineal, límite de cuantificación (LC)

Se analizaron 3 placas en las que se analizaron (por triplicado) las siguientes concentraciones del estándar: 100, 40, 12, 3, 1 ng/mL.

El análisis de los resultados de linealidad, rango lineal, límite de cuantificación se muestra en la Tabla 3.44.

Tabla 3.44. Estudio de la linealidad, rango lineal y LC en la cuantificación de HCPs.

| | | [HCPs] (ng/mL) | | | | | | | | | |
|---------|---|---------------------|----------|---------------------|-----------|-------|--------|---------------------|--------|------------------|--------|
| | | 100 | 40 | 12 | 3 | 1 | | | | | |
| PLACA 1 | Promedio Abs _{405nm} (n=5) | 1.100 | 0.418 | 0.131 | 0.028 | 0.012 | | | | | |
| | Exactitud (%) | 100.1 | 98.8 | 107.5 | 90.5 | 98.9 | | | | | |
| | Precisión (100 - CV) (%) | 95.7 | 96.6 | 96.1 | 93.9 | 91.9 | | | | | |
| | Rango lineal (cumple exactitud y precisión 80 - 120%): | √ | √ | √ | √ | √ | | | | | |
| | Ecuación de la curva: | a (A ₁) | 0.00395 | c (X ₀) | 2 101 120 | b (p) | 1.0575 | d (A ₂) | 41 149 | R ² = | 0.9994 |
| | Límite de Cuantificación (menor valor con precisión y exactitud 75-125%): | 1 ng/mL | | | | | | | | | |
| | | [HCPs] (ng/mL) | | | | | | | | | |
| | | 100 | 40 | 12 | 3 | 1 | | | | | |
| PLACA 2 | Promedio Abs _{405nm} (n=5) | 1.163 | 0.516 | 0.132 | 0.028 | 0.011 | | | | | |
| | Exactitud (%) | 100.0 | 99.9 | 99.9 | 100.0 | 91.4 | | | | | |
| | Precisión (100 - CV) (%) | 96.8 | 90.8 | 95.8 | 92.3 | 94.6 | | | | | |
| | Rango lineal (cumple exactitud y precisión 80 - 120%): | √ | √ | √ | √ | √ | | | | | |
| | Ecuación de la curva: | a (A ₁) | 0.00603 | c (X ₀) | 118 | b (p) | 1.3016 | d (A ₂) | 2.6 | R ² = | 0.9994 |
| | Límite de Cuantificación (menor valor con precisión y exactitud 75-125%): | 1 ng/mL | | | | | | | | | |
| | | [HCPs] (ng/mL) | | | | | | | | | |
| | | 100 | 40 | 12 | 3 | 1 | | | | | |
| PLACA 3 | Promedio Abs _{405nm} (n=5) | 1.148 | 0.472 | 0.140 | 0.029 | 0.009 | | | | | |
| | Exactitud (%) | 99.9 | 99.7 | 100.1 | 93.2 | 112.5 | | | | | |
| | Precisión (100 - CV) (%) | 98.0 | 97.9 | 95.7 | 96.6 | 89.3 | | | | | |
| | Rango lineal (cumple exactitud y precisión 80 - 120%): | √ | √ | √ | √ | √ | | | | | |
| | Ecuación de la curva: | a (A ₁) | -0.00392 | c (X ₀) | 1 240 | b (p) | 1.0119 | d (A ₂) | 15.9 | R ² = | 1.0000 |
| | Límite de Cuantificación (menor valor con precisión y exactitud 75-125%): | 1 ng/mL | | | | | | | | | |

Se pudo concluir que el rango desde 100 ng/mL hasta 1 ng/mL de HCP cumplía el criterio de aceptación de exactitud 80-120 % y precisión 80-120 %.

Precisión intraplaca e interplaca

La *precisión* se calculó intra e interplaca (Tabla 3.45) analizando el coeficiente de variación entre las medidas dentro de cada placa y entre las distintas placas del apartado anterior.

Tabla 3.45. Precisión intraplaca (tabla superior) e interplaca (tabla inferior) en la cuantificación de HCPs.

| | | [HCPs] (ng/mL) | | | | |
|------------------------|-------------------------------------|----------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 100 | 40 | 12 | 3 | 1 |
| PLACA 1 | Promedio Abs _{450nm} (n=5) | 1.110 | 0.418 | 0.131 | 0.028 | 0.012 |
| | Desv. Est. | 0.047 | 0.014 | 0.005 | 0.002 | 0.001 |
| | CV (%) | 4.3 | 3.4 | 3.9 | 6.1 | 8.1 |
| PLACA 2 | Promedio Abs _{450nm} (n=5) | 1.163 | 0.516 | 0.132 | 0.028 | 0.011 |
| | Desv. Est. | 0.037 | 0.048 | 0.006 | 0.002 | 0.001 |
| | CV (%) | 3.2 | 9.2 | 4.2 | 7.7 | 5.4 |
| PLACA 3 | Promedio Abs _{450nm} (n=5) | 1.148 | 0.472 | 0.140 | 0.029 | 0.009 |
| | Desv. Est. | 0.023 | 0.010 | 0.006 | 0.001 | 0.001 |
| | CV (%) | 2.0 | 2.1 | 4.3 | 3.4 | 10.7 |
| PLACA S 1, 2 Y 3 | Promedio Abs _{450nm} (n=3) | 1.140 | 0.469 | 0.134 | 0.028 | 0.011 |
| | Desv. Est. | 0.027 | 0.049 | 0.005 | 0.001 | 0.002 |
| | CV (%) | 2.4 | 10.4 | 3.9 | 2.9 | 13.9 |

En este apartado se pudo concluir que:

- La *precisión intraplaca* fue inferior al 11 % en todas las concentraciones de HCP ensayadas, por lo que cumplía el criterio de aceptación (CV<20 %).
- La *precisión interplaca* fue inferior al 14 % en todas las concentraciones de HCP ensayadas, por lo que cumplía el criterio de aceptación (CV<20 %).

Repetibilidad

La *repetibilidad* se estudió realizando 6 lecturas consecutivas de las placas mencionadas anteriormente. El coeficiente de variación en las 6 repeticiones consecutivas de la medida a 450 nm en todos los pocillos del experimento no superó el 2 %, por lo que cumplió el criterio de aceptación (CV<10 %) (datos no mostrados).

Exactitud

La *exactitud* se midió:

- a) **por patrones**, cuantificando 3 concentraciones de patrón de endotoxinas (1, 50 y 100 ng/mL) por sextuplicado (ver Tabla 3.46) mediante la fórmula:

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{Conc. media determinada}}{\text{Conc. teórica}} \times 100$$

Tabla 3.46. Medida de la exactitud por patrones (cuantificación de HCP).

| [HCP] teórica (ng/mL) | [HCP] medida 1 (ng/mL) | [HCP] medida 2 (ng/mL) | [HCP] medida 3 (ng/mL) | [HCP] medida 4 (ng/mL) | [HCP] medida 5 (ng/mL) | [HCP] medida 6 (ng/mL) | Promedio [HCP] (ng/mL) | CV (%) | Exactitud (%) |
|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------|---------------|
| 1 | 1.45 | 1.29 | 0.96 | 1.04 | 0.80 | 0.96 | 1.08 | 22.00 | 108.3 |
| 50 | 56.29 | 49.65 | 52.61 | 48.87 | 53.05 | 65.66 | 54.36 | 11.30 | 108.7 |
| 100 | 131.27 | 110.54 | 101.39 | 105.43 | 109.59 | 112.83 | 111.84 | 9.25 | 111.8 |

- b) **por el método de adiciones y posterior estudio de las recuperaciones** (cuantificando una mezcla de una muestra de QG31 más el patrón de endotoxinas empleado para la recta y calculando la recuperación, ver Tabla 3.47) mediante la fórmula:

$$\text{Exactitud (Recuperación)} = \frac{\text{Conc.} \cdot (\text{Muestra} + \text{Adicionada}) - \text{Conc.} \cdot \text{Muestra}}{\text{Conc.} \cdot \text{Adicionada}} \times 100$$

Tabla 3.47. Medida de la exactitud por el método de adiciones y posterior estudio de las recuperaciones (cuantificación de HCPs).

| Muestra | [HCP] medida 1 (ng/mL) | [HCP] medida 2 (ng/mL) | [HCP] medida 3 (ng/mL) | Promedio [HCP] (ng/mL) | CV (%) | Exactitud (%) |
|-----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|--------|---------------|
| Muestra QG31 | 16.66 | 14.02 | 17.49 | 16.05 | 11.3 | - |
| Muestra QG31 + 5 ng/mL HCP | 22.98 | 21.81 | 20.22 | 21.67 | 6.4 | 112.3 |
| Muestra QG31 + 10 ng/mL HCP | 28.68 | 25.74 | 26.41 | 26.94 | 5.7 | 108.9 |
| Muestra QG31 + 20 ng/mL HCP | 41.87 | 43.68 | 38.87 | 41.47 | 5.9 | 127.1 |

Se pudo concluir que se cumplió el criterio de aceptación de exactitud 80-120 % excepto en el caso concreto de adición de 20 ng/mL HCPs a una muestra purificada de QG31.

Selectividad (efecto matriz)

Según la hoja de producto del kit "Immunoenzymetric Assay for the Measurement of *E. coli* Host Cell Proteins" (Catalog F410, Cygnus Technologies) el criterio de aceptación es que el valor de la concentración de HPC del estándar 20 ng/mL en la matriz esté en el rango 15 a 30 ng/mL (lo que equivale a una recuperación de 75-150 %).

Los datos del estudio de matrices se detallan en la Tabla 3.48.

Tabla 3.48. Efecto matriz (selectividad) en la cuantificación de HCP.

| [NaCl] (mM) | [HCPs] (ng/mL) | CV (%) | Cumple rango 15-30 ng/mL | [Sulfato amónico] (mM) | [HCPs] (ng/mL) | CV (%) | Cumple rango 15-30 ng/mL |
|------------------------------|----------------|--------|--------------------------|------------------------------|----------------|--------|--------------------------|
| 500 | 20.41 | 7.3 | √ | 500 | 24.30 | 11.8 | √ |
| 400 | 21.27 | 1.1 | √ | 400 | 21.68 | 4.6 | √ |
| 300 | 22.13 | 4.8 | √ | 300 | 22.92 | 3.7 | √ |
| 200 | 22.20 | 4.0 | √ | 200 | 21.70 | 2.5 | √ |
| 100 | 23.80 | 2.2 | √ | 100 | 22.57 | 1.6 | √ |
| 50 | 25.21 | 2.8 | √ | 50 | 23.66 | 3.3 | √ |
| 25 | 24.64 | 6.3 | √ | 25 | 24.75 | 2.6 | √ |
| [TrisHCl] pH 8 (mM) | [HCPs] (ng/mL) | CV (%) | Cumple rango 15-30 ng/mL | [Acetato sódico] pH 5.5 (mM) | [HCPs] (ng/mL) | CV (%) | Cumple rango 15-30 ng/mL |
| 100 | 27.22 | 2.4 | √ | 100 | 24.72 | 4.2 | √ |
| 50 | 24.97 | 3.9 | √ | 50 | 25.21 | 7.2 | √ |
| 20 | 26.20 | 2.1 | √ | 20 | 26.29 | 6.0 | √ |
| [Citrato sódico] pH 5.5 (mM) | [HCPs] (ng/mL) | CV (%) | Cumple rango 15-30 ng/mL | [Carbonato sódico] pH 8 (mM) | [HCPs] (ng/mL) | CV (%) | Cumple rango 15-30 ng/mL |
| 100 | 19.25 | 2.1 | √ | 100 | 29.79 | 2.3 | √ |
| 50 | 22.25 | 2.2 | √ | 50 | 27.77 | 1.5 | √ |
| 20 | 25.62 | 2.8 | √ | 20 | 26.94 | 0.8 | √ |
| [Fosfato sódico] pH 8 (mM) | [HCPs] (ng/mL) | CV (%) | Cumple rango 15-30 ng/mL | | | | |
| 100 | 23.98 | 1.7 | √ | | | | |
| 50 | 25.49 | 8.2 | √ | | | | |
| 20 | 26.29 | 1.1 | √ | | | | |

En este apartado se pudo concluir que en todos los casos el valor de la concentración del estándar 20 ng/mL obtenido están en el rango 15-30 ng/mL.

Conclusiones

En base a los ensayos anteriores se establecieron las especificaciones que se resumen en la Tabla 3.49.

Tabla 3.49. Especificaciones del método analítico "Cuantificación de HCP".

| METODO ANALÍTICO | RANGO LINEAL | LC (Límite de cuantificación) | PRECISIÓN | EXACTITUD | CONCENTRACIONES DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN |
|------------------|-------------------|-------------------------------|-----------|-----------|--|
| HCP | 1 - 100 ng/mL HCP | 1 ng/mL HCP | 80-120 % | 80-120 % | 100, 40, 12, 3, y 1 ng/mL HCP |

3.3. DESARROLLO DE LA ETAPA USP

El proceso global de USP (*UpStream Process*) se divide en dos etapas o unidades de proceso:

- Fermentación y recolección de la biomasa celular
- Lisis y clarificación

Al final de cada etapa se obtiene un producto intermedio denominado "biomasa" y "lisado clarificado" respectivamente (Figura 3.24).

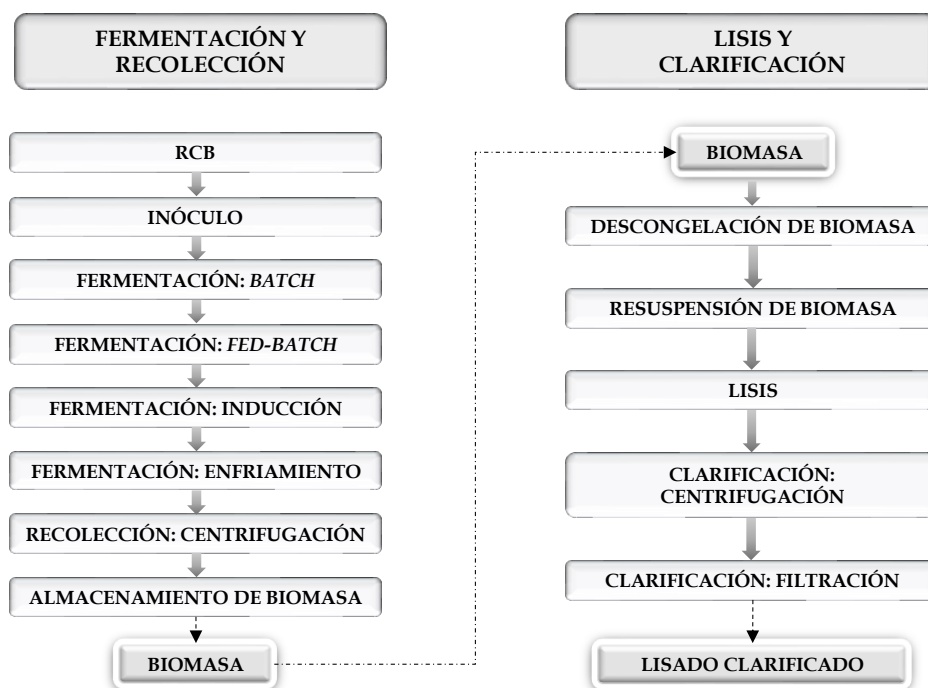


Figura 3.15. Esquema del proceso USP (*UpStream Process*) mediante el cual se obtiene la biomasa que ha expresado QG31 (izquierda) y el lisado clarificado (derecha).

Siguiendo el concepto de Calidad desde el diseño (*Quality by Design*), durante el desarrollo de la etapa USP y con el objetivo de determinar los valores óptimos de los parámetros críticos y el rango de trabajo de los mismos, se empleó el diseño de experimentos (DoE, *Design of Experiments*).

3.3.1. Crecimiento y expresión con la cepa *E. coli* LBP FTO PJ411_QG31

En la primera fase de desarrollo (Apartado “3.2. Primera fase de desarrollo”) se empleó la cepa *E. coli* (BL21) transformada con el plásmido pET26b(+) que contenía la secuencia codificante de QG31. En esta segunda fase, en la que se define el proceso de purificación de QG31, se empleó la cepa *E. coli* LBP FTO (LeanBioPro, *Freedom To Operate*) transformada con el plásmido pJ411 que contenía la secuencia codificante de QG31 (plásmido pJ411_QG31).

El cambio de cepa implicó la generación de un nuevo RCB (*Research Cell Bank*) así como nuevos estudios de crecimiento y expresión que se llevaron a cabo tanto en matraz como a escala de biorreactor. se llevaron a cabo

Partiendo de alícuotas de este RCB y con el objetivo de determinar la velocidad específica de crecimiento (μ) y la densidad óptica alcanzada al agotarse la glucosa (Figura 3.25), se realizó una primera fermentación en modo discontinuo (*batch*).

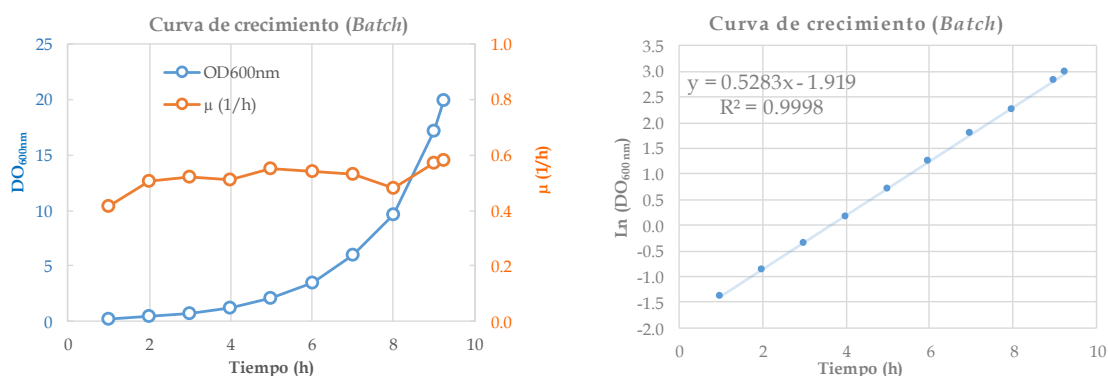


Figura 3.16. Curva de crecimiento de la cepa *E. coli* LBP FTO-pJ411_QG31 y cálculo de la velocidad de crecimiento en modo discontinuo (*batch*). Panel izquierdo: densidad óptica a 600 nm (azul) y la velocidad de crecimiento (naranja) en función del tiempo (horas). Panel derecho: logaritmo neperiano de la densidad óptica en función del tiempo para el cálculo de la velocidad de crecimiento.

Se observó un crecimiento con una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.53 h^{-1} que alcanzaba una DO_{600} de 19.9 UA al final de la fase discontinua.

Conociendo estos parámetros, se realizó una nueva fermentación en la que, tras la fase discontinua, se creció el cultivo en modo semicontinuo (*fed-batch*) adaptando el perfil de alimentación empleado en la primera etapa de producción de QG31 para un crecimiento con una μ de 0.2 h^{-1} , a la densidad óptica alcanzada al final de la fase *batch* de la cepa *E. coli* LBP FTO-pJ411_QG31 (DO_{600} de 19.9 UA) (Figura 3.26). El perfil de alimentación permitió un crecimiento con una μ de 0.197 h^{-1} , de modo que se fijó dicho perfil en las sucesivas fermentaciones.

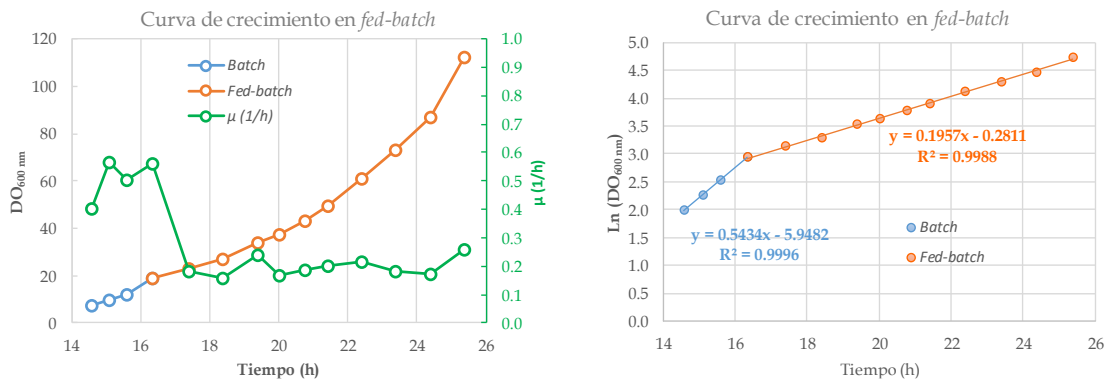


Figura 3.17. Cálculo de la velocidad de crecimiento de la cepa *E. coli* LBP FTO-pJ411_QG31 en las fases *batch* y *fed-batch*. En el panel izquierdo, en el eje izquierdo, se muestran la densidad óptica en las fases *batch* (azul) y *fed-batch* (naranja) y, en el eje derecho, la velocidad específica de crecimiento (verde), respecto al tiempo transcurrido (horas). En el panel derecho se muestra el logaritmo neperiano de la densidad óptica del cultivo respecto al tiempo transcurrido (horas). Se muestra la ecuación de la recta tanto para la fase *batch* (azul) como *fed-batch* (naranja).

Se llevaron a cabo tres fermentaciones que incluyeron las fases de *batch* (modo discontinuo), *fed-batch* (modo semicontinuo) e inducción de la expresión de QG31. La inducción se realizó a 37 °C con 1 mM de IPTG durante 3 h, tras las cuales el cultivo se enfrió por debajo de 15 °C.

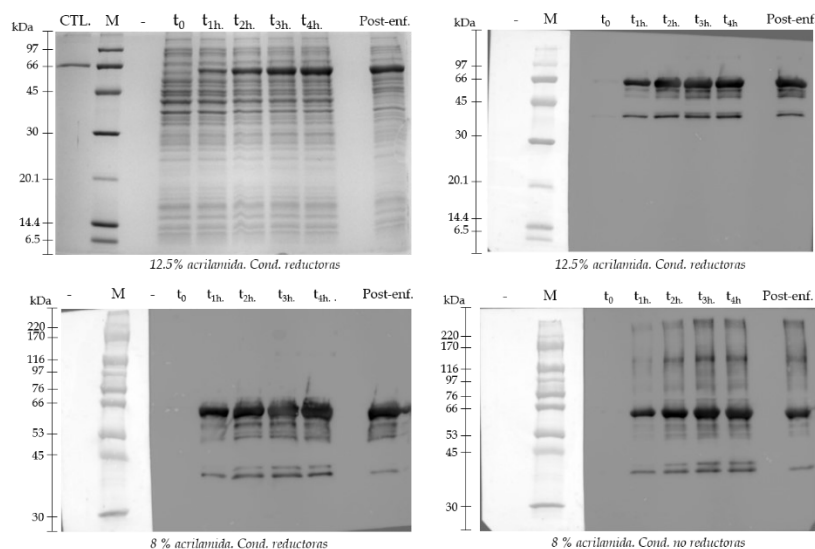


Figura 3.18. Cinética de expresión de QG31 de la cepa *E. coli* LBP FTO-pJ411_QG31 en biorreactor (n=3) tras inducción a 37 °C con 1 mM IPTG. Panel superior: porcentaje de expresión de QG31 (analizado mediante SDS-PAGE en geles de 12.5 % de acrilamida en condiciones reductoras). Panel central izquierdo: SDS-PAGE (12.5 % acrilamida, condiciones reductoras). Panel central derecho: Western blot (12.5 % acrilamida, condiciones reductoras). Panel inferior izquierdo: Western blot (8 % acrilamida, condiciones reductoras). Panel inferior derecho: Western blot (8 % acrilamida, condiciones no reductoras).

En los tres casos la velocidad de crecimiento durante la fase *fed-batch* fue de 0.2 h⁻¹ y el porcentaje de QG31 tras la inducción alcanzó un promedio de 39.4 % (analizado por densitometría en SDS-PAGE) (Figura 3.27).

3.3.2. Diseño de experimentos (DoE) para la etapa USP

Como un primer paso del desarrollo del proceso de USP se llevó a cabo un análisis de riesgos para cada unidad de proceso. En primer lugar, se identificaron los parámetros que podían afectar

a atributos críticos del producto. En segundo lugar, estos parámetros se clasificaron (Tabla 3.50) en tres niveles de riesgo según la probabilidad de que pudieran afectar a dichos atributos críticos:

- Nivel 1: alta probabilidad
- Nivel 2: probabilidad media
- Nivel 3: baja probabilidad

Tabla 3.50. Nivel de riesgo de los parámetros críticos implicados en las unidades de proceso “Fermentación” y “Lisis” de la etapa USP.

| Unidad de proceso | Parámetro | Nivel de riesgo |
|---|---------------------------------------|-----------------|
| Fermentación | Temperatura de inducción | 1 |
| | Concentración de IPTG | |
| | DO ₆₀₀ de inducción | |
| | μ en la etapa <i>fed-batch</i> | |
| | Presión de oxígeno (pO ₂) | 2 |
| | pH | |
| | Volumen inicial/final | 3 |
| | Proporción de inóculo | |
| DO ₆₀₀ final del cultivo en matraz | | |
| DO ₆₀₀ inicial en biorreactor | | |
| Lisis | Presión | 1 |
| | Número de pases | |
| | DO ₆₀₀ del cultivo celular | |
| | Temperatura | 3 |

En el desarrollo de nuestro proceso, sólo se estudiaron los parámetros con una alta probabilidad (Nivel de riesgo 1) de afectar a los atributos de calidad críticos. Se llevó a cabo el diseño de experimentos con un diseño compuesto central centrado en la cara (CCF) y los datos fueron analizados con el software *StatgraphicsXVII*.

3.3.2.1. DISEÑO DE EXPERIMENTOS EN LA ETAPA DE BIORREACTOR (FERMENTACIÓN)

En la unidad de proceso de fermentación y recolección de la biomasa, se clasificaron 4 parámetros en nivel 1 de riesgo con respecto a la inducción de la expresión de QG31 durante la fermentación en el biorreactor (Tabla 3.50):

- Temperatura de inducción
- Concentración de IPTG
- Densidad óptica del cultivo para la inducción
- Velocidad específica de crecimiento (μ) durante la fase semicontinua (*fed-batch*) de la fermentación

Dado el alto número de fermentaciones necesario para estudiar estos 4 parámetros a escala de biorreactor, los parámetros temperatura de inducción y concentración de IPTG se estudiaron a escala de matraz.

a) Efecto de la temperatura de inducción y concentración de IPTG sobre la expresión de QG31

En experimentos anteriores, las condiciones para la inducción de QG31 en la cepa *E. coli* LBP FTO PJ411_QG31 fueron: una temperatura de inducción de 37 °C y una concentración de IPTG de 1 mM. Estas condiciones proporcionaron una buena expresión de QG31, pero se detectaron también de variantes de alto y bajo peso molecular (Figura 3.27). Una menor temperatura y/o concentración de IPTG podrían tener un impacto positivo en la reducción de dichas variantes, manteniendo niveles de expresión de QG31 adecuados.

Para ello, se estudió mediante el diseño de experimentos a escala de matraz, el efecto de la reducción de la temperatura y la concentración de IPTG. Concretamente, se probaron las temperaturas de 23 °C, 30 °C y 37 °C, así como las concentraciones de IPTG: 0.1 mM, 0.55 mM y 1 mM. Para el estudio de dos parámetros de 3 niveles cada uno, el modelo CCF (modelo compuesto central centrado en la cara) estableció las siguientes condiciones:

Tabla 3.51. Niveles estudiados en el diseño de experimentos para las condiciones de temperatura y concentración de IPTG para la inducción de QG31 en la cepa *E. coli* LBP FTO PJ411_QG31.

| N° experimento | Nivel de DoE | | Condiciones del nivel | |
|----------------|--------------|--------|-----------------------|-------------|
| | Temperatura | [IPTG] | Temperatura (°C) | [IPTG] (mM) |
| 1 | 1 | -1 | 37 | 0.1 |
| 2 | 1 | 1 | 37 | 1 |
| 3 | -1 | -1 | 23 | 0.1 |
| 4 | -1 | 1 | 23 | 1 |
| 5 | 1 | 0 | 37 | 0.55 |
| 6 | -1 | 0 | 23 | 0.55 |
| 7 | 0 | 1 | 30 | 1 |
| 8 | 0 | -1 | 30 | 0.1 |
| 9 | 0 | 0 | 30 | 0.55 |
| 10 | 0 | 0 | 30 | 0.55 |
| 11 | 0 | 0 | 30 | 0.55 |

Los cultivos se crecieron a 37 °C hasta una densidad óptica de 0.6-0.8 UA, momento en el que se enfriaron hasta alcanzar la correspondiente temperatura de inducción y se indujeron a la correspondiente concentración de IPTG. Tras 3 h de inducción, se recogieron muestras de los cultivos para analizar el nivel de expresión de QG31 (mediante densitometría en SDS-PAGE, Figura 3.28). Adicionalmente, se analizó la presencia de variantes de alto y bajo peso molecular mediante Western blot observándose un patrón de bandas similar en todas las condiciones testeadas (datos no mostrados).

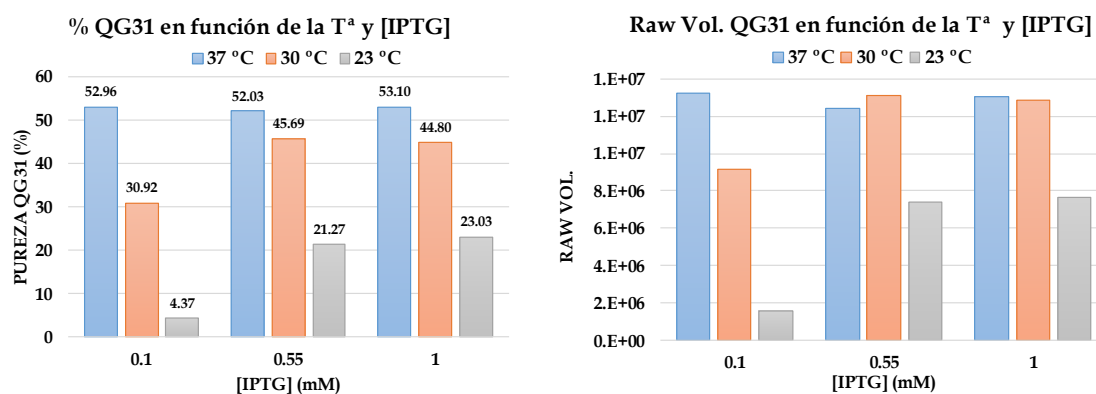


Figura 3.19. Efecto de la temperatura de inducción y concentración de IPTG sobre la expresión de QG31. Se muestra la pureza de QG31 (panel izquierdo) y el *Raw Vol.* (intensidad de la banda de QG31) (panel derecho) en función de la temperatura de inducción y la concentración de IPTG.

Se realizó un análisis del contorno de superficie estimada y un diagrama de Pareto (modelo compuesto central centrado en la cara (CCF) obtenido mediante el software *StatgraphicsXVII*) (Figura 3.29).

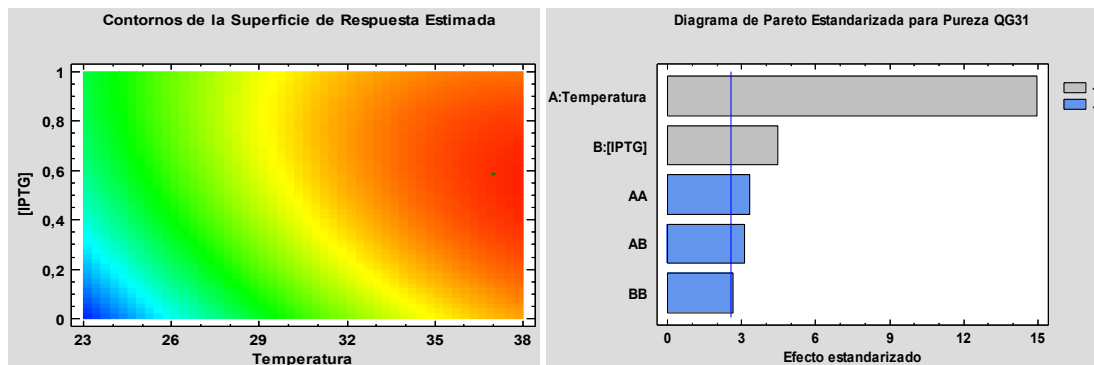


Figura 3.20. Análisis de la pureza de QG31 en función de la temperatura de inducción y la concentración de IPTG adicionada para la inducción. Panel izquierdo: contorno de la superficie estimada. Panel derecho: diagrama de Pareto.

Del análisis del nivel de expresión de QG31 (Figura 3.29, panel derecho), se pudo concluir que ambos factores (temperatura y concentración de IPTG) afectaban al porcentaje de QG31, siendo mayor el efecto de la temperatura. Las condiciones que el modelo estableció para una máxima expresión de QG31 en matraz (figura 3.29, panel izquierdo) fueron 37 °C y 0.59 mM IPTG.

Las condiciones establecidas por el modelo como las óptimas en matraz, 37 °C y 0.6 mM IPTG, se testearon en el biorreactor (Figura 3.30).

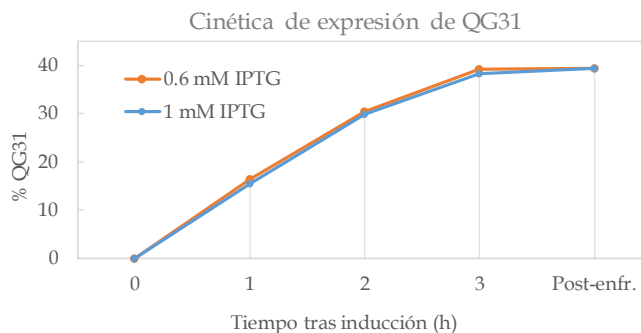


Figura 3.21. Comparación de los niveles de expresión de QG31 en la cepa *E. coli* LBP FTO PJ411_QG31 tras inducción a 37 °C con 1 mM IPTG (azul) o 0.6 mM IPTG (naranja) en biorreactor.

Se pudo concluir que los niveles de expresión a 37 °C con 0.6 mM IPTG y 1 mM fueron prácticamente idénticos, en torno a 39 %. Dichas condiciones de inducción (37 °C y 0.6 mM IPTG) fueron las que se fijaron para las sucesivas fermentaciones llevadas a cabo en el biorreactor.

b) Efecto de la densidad óptica de inducción y la velocidad de crecimiento durante la fase semicontinua (*fed-batch*) (DoE)

Una vez establecidas la temperatura de inducción (37 °C) y la concentración de IPTG (0.6 mM), se estudiaron tanto la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) del cultivo en el momento de la inducción como la velocidad de crecimiento (μ) durante la fase discontinua de la fermentación.

Para caracterizar la velocidad de crecimiento, se realizaron una serie de fermentaciones para estudiar el perfil de adición de sustrato durante la fase de *fed-batch* en biorreactor y comprobar que se podía controlar el crecimiento de la cepa *E. coli* LBP FTO PJ411_QG31 a diferentes velocidades. Se comprobó que desde $\mu = 0.15$ a $\mu = 0.24$ h⁻¹, la velocidad era controlable y reproducible, permitiendo definir el espacio de diseño previo al diseño de experimentos (Figura 3.31).

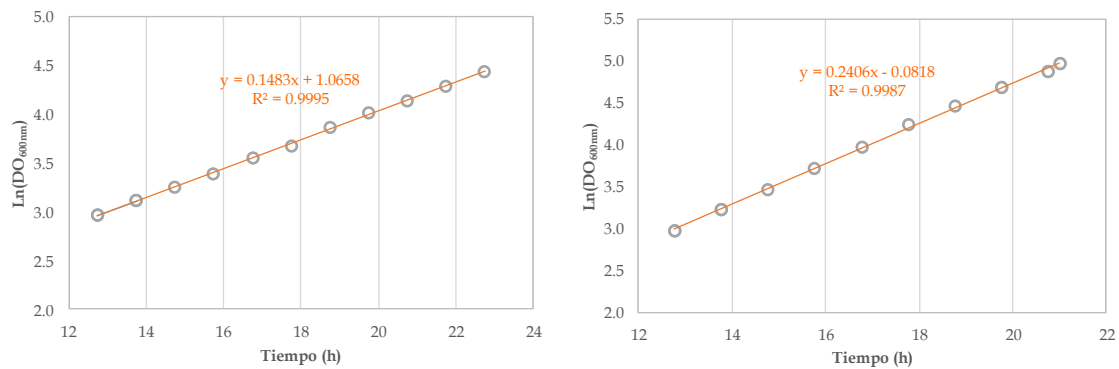


Figura 3.22. Representación logarítmica del crecimiento en biorreactor en fed-batch de la cepa *E. coli* LBP FT0 PJ411_QG31 para el cálculo de la velocidad específica de crecimiento (pendiente del ajuste lineal). Panel izquierdo: $\mu = 0.15 \text{ h}^{-1}$. Panel derecho: $\mu = 0.24 \text{ h}^{-1}$.

Para estudiar mediante diseño de experimento (DoE) la influencia de la densidad óptica y la velocidad de crecimiento durante la fase semicontinua (*fed-batch*) en los niveles de expresión de QG31, se establecieron tres niveles para cada parámetro (65, 75, 85 UA y 0.15, 0.20, 0.25 h^{-1} respectivamente), obteniéndose como resultado las condiciones recogidas en la Tabla 3.52.

Tabla 3.52. Condiciones del diseño de experimentos para analizar el efecto de los parámetros "densidad óptica (DO_{600}) de inducción" y "velocidad de crecimiento en la fase discontinua (μ fed-batch)" en 3 niveles sobre la calidad del producto QG31.

| Nº experimento | Nivel de DoE | | Condiciones del nivel | |
|----------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| | DO_{600} inducción (UA) | μ fed-batch (h^{-1}) | DO_{600} inducción (UA) | μ fed-batch (h^{-1}) |
| 1 | 0 | 0 | 75 | 0.2 |
| 2 | 1 | 0 | 85 | 0.2 |
| 3 | -1 | 1 | 65 | 0.25 |
| 4 | 1 | -1 | 85 | 0.15 |
| 5 | 1 | 1 | 85 | 0.25 |
| 6 | -1 | -1 | 65 | 0.15 |
| 7 | -1 | 0 | 65 | 0.2 |
| 8 | 0 | 1 | 75 | 0.25 |
| 9 | 0 | 0 | 75 | 0.2 |
| 10 | 0 | -1 | 75 | 0.15 |
| 11 | 0 | 0 | 75 | 0.2 |

Las fermentaciones de cada experimento se llevaron a cabo a la velocidad de crecimiento establecida según la condición hasta la densidad óptica correspondiente y la expresión de QG31 se indujo a 0.6 mM IPTG. Durante la inducción, se mantuvo el perfil de alimentación de la fase semicontinua (*fed-batch*) para un crecimiento a la velocidad correspondiente. Tras 3 h de inducción y un enfriamiento del cultivo por debajo de 15 °C, se analizaron:

- las variantes de alto y bajo peso molecular por Western blot. Los resultados mostraron un patrón de bandas similar en todas las condiciones estudiadas (datos no mostrados)
- la expresión de QG31 (mediante el cálculo del porcentaje de QG31 por densitometría en SDS-PAGE) (Figura 3.32)

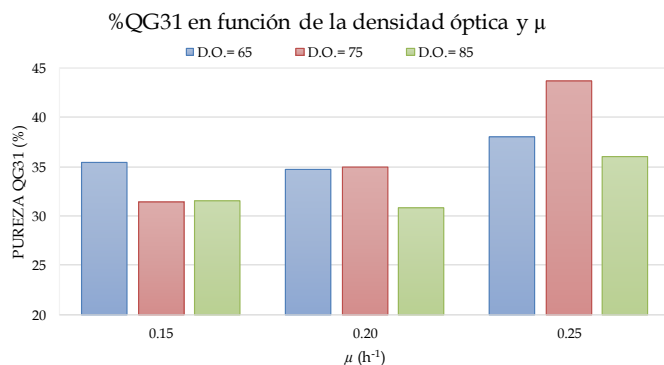


Figura 3.23. Expresión de QG31 en función de la densidad óptica de inducción y de la velocidad de crecimiento (μ) durante la fase discontinua de la fermentación.

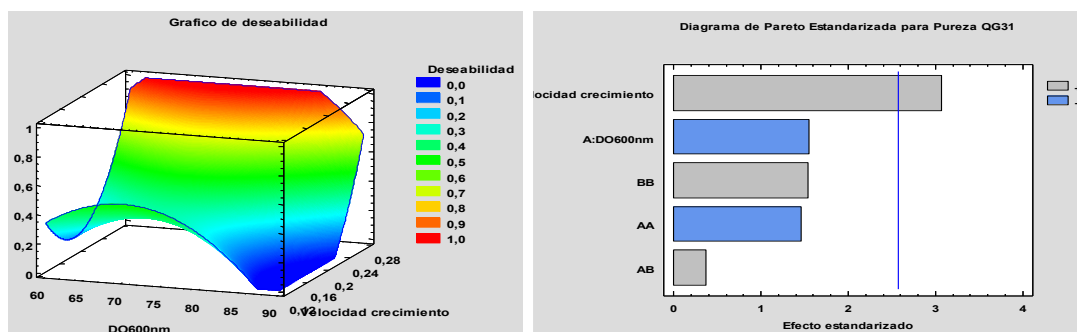


Figura 3.24. Contorno de la superficie estimada (panel izquierdo) y diagrama de Pareto (panel derecho) del análisis de la pureza de QG31 en función de la densidad óptica y la velocidad de crecimiento.

El modelo compuesto central centrado en la cara (CCF) obtenido mediante el software *StatgraphicsXVII* mostró que el parámetro que más afectaba al resultado de la expresión de QG31 era la velocidad de crecimiento (Figura 3.33, panel derecho).

Tras establecer el siguiente rango de trabajo:

- $\mu = 0.2 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$
 - DO_{600} de inducción = $75 \pm 5 \text{ AU}$
- se predijo la variación de la expresión de QG31 respecto al punto central (Tabla 3.53).

Tabla 3.53. Predicción de la expresión de QG31 mediante *StratGraphics* (modelo CCF) dentro del rango de trabajo establecido ($\mu = 0.2 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$ y DO_{600} de inducción = $75 \pm 5 \text{ AU}$).

| Modelo DoE | | | | |
|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------|-----------------|--|
| Descripción | $\text{DO}_{600\text{nm}}$ (UA) | μ (h ⁻¹) | Pureza QG31 (%) | Diferencia respecto al punto central (%) |
| Punto central | 75 | 0.2 | 35.1 | 0 |
| μ constante | 70 | 0.2 | 35.3 | 0.6 |
| | 80 | 0.2 | 33.7 | -4 |
| $\text{DO}_{600\text{nm}}$ constante | 75 | 0.18 | 34.2 | -2.5 |
| | 75 | 0.22 | 36.8 | 4.8 |
| Extremos | 70 | 0.18 | 34.5 | -1.6 |
| | 70 | 0.22 | 36.9 | 5.2 |
| | 80 | 0.18 | 32.7 | -6.8 |
| | 80 | 0.22 | 35.5 | 1.1 |

Se comprobó con el modelo que la mayor diferencia de expresión de QG31 (en SDS-PAGE al 12.5 % en condiciones reductoras) respecto al punto central, en el rango de trabajo establecido era inferior al 10 % (el máximo valor fue de 6.8 %).

3.3.2.2. DISEÑO DE EXPERIMENTOS EN LA ETAPA DE LISADO

En lo que respecta a la unidad de proceso de lisis y clarificación, se asignó el nivel 1 de riesgo a tres parámetros: presión, número de pases y densidad óptica del cultivo celular (Tabla 3.50).

Para definir el espacio de diseño previo al diseño de experimentos, se llevaron a cabo una serie de experimentos en los que se estudió el efecto de la presión aplicada para que se produzca la lisis sobre la calidad del producto QG31. Se llevaron a cabo hasta 3 pases de lisis en el disruptor celular a presiones en el rango de 500 a 1500 bar. En el sobrenadante cada ensayo se cuantificó la proteína total mediante Bradford y se estudió la pureza de QG31 (mediante SDS-PAGE) y la identidad mediante Western blot (Figura 3.34).

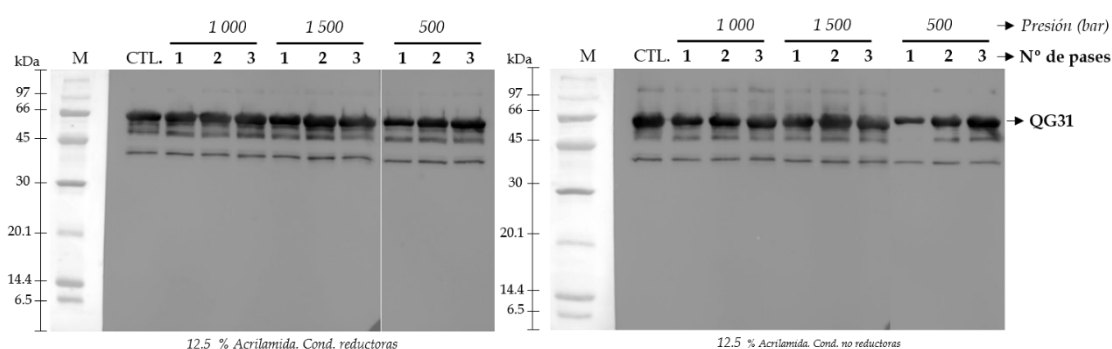


Figura 3.25. Análisis del efecto de la presión y nº de pases durante la lisis sobre la calidad del producto QG31 mediante Western blot.

El patrón de bandas observado fue similar en todos los ensayos, y el mayor rendimiento de QG31 (medido como mg de QG31/ mL calculado a partir de la pureza en SDS-PAGE y la cantidad de proteína total mediante Bradford) se obtuvo con dos pases a una presión de 1000 bar (Figura 3.35).

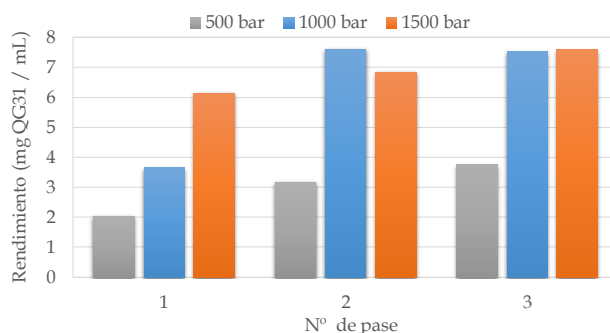


Figura 3.26. Rendimiento de QG31 en función de la presión y el número de pases en el disruptor celular.

Teniendo en cuenta estos resultados, para el diseño de experimentos de la etapa de lisis y clarificación, en el que se establecieron tres parámetros (con tres niveles cada uno):

- densidad del cultivo (85, 100 y 115 UA)
- presión (750, 1000 y 1250 bar)
- número de pases (1, 2 y 3 pases)

el modelo CCF definió las condiciones recogidas en la Tabla 3.54.

Tabla 3.54. Condiciones del diseño de experimentos para analizar el efecto de los parámetros de la lisis sobre el rendimiento de QG31. Se establecen 3 parámetros (densidad del cultivo, presión y número de pases) con 3 niveles cada uno.

| Condición | DO _{600 nm} del cultivo (UA) | Presión (bar) | Nº pases |
|-----------|---------------------------------------|---------------|----------|
| 1 | 85 | 1000 | 2 |
| 2 | 115 | 1250 | 3 |
| 3 | 100 | 750 | 2 |
| 4 | 85 | 1250 | 3 |
| 5 | 115 | 1000 | 2 |
| 6 | 100 | 1000 | 2 |
| 7 | 115 | 1250 | 1 |
| 8 | 100 | 1000 | 2 |
| 9 | 100 | 1250 | 2 |
| 10 | 115 | 750 | 1 |
| 11 | 100 | 1000 | 1 |
| 12 | 85 | 750 | 1 |
| 13 | 115 | 750 | 3 |
| 14 | 100 | 1000 | 2 |
| 15 | 85 | 1250 | 1 |
| 16 | 100 | 1000 | 3 |
| 17 | 85 | 750 | 3 |

Las muestras generadas se analizaron por Bradford, SDS-PAGE y Western blot observándose que el patrón de bandas también fue similar en todas las condiciones analizadas (datos no mostrados).

En cuanto al rendimiento de QG31 (expresado como mg de QG31/mL), el análisis de los datos mostró que los parámetros que más influencia tuvieron sobre el mismo fueron la densidad óptica y la presión (Figura 3.36).

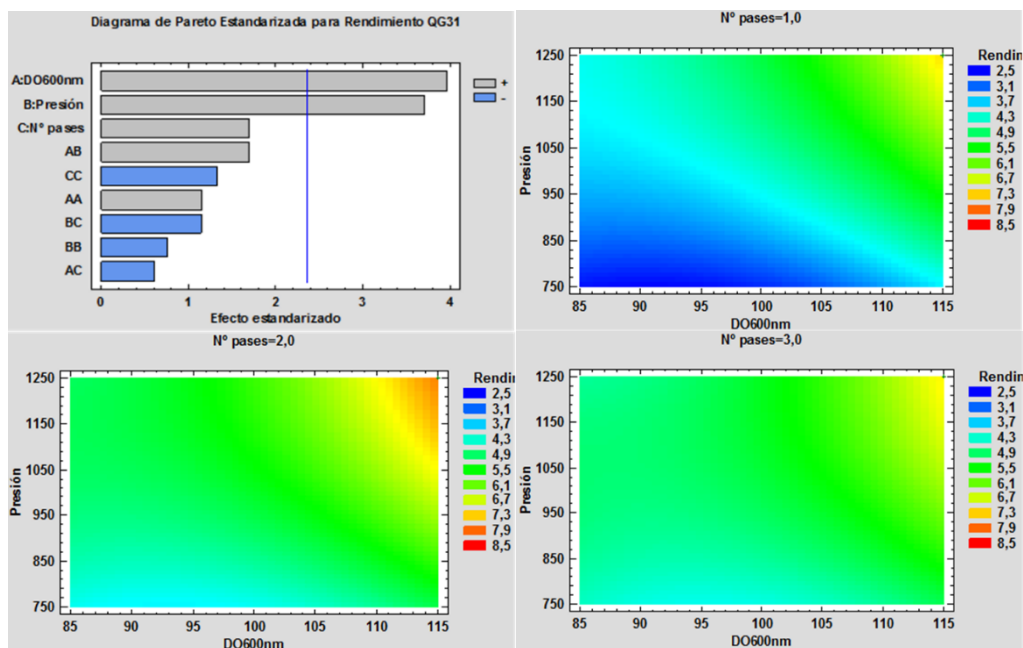


Figura 3.27. Análisis de la pureza de QG31 en función de la densidad óptica, la presión y el número de pases de la lisis. Panel superior izquierdo: diagrama de Pareto. Panel superior derecho y paneles inferiores: contorno de la superficie estimada.

Según el modelo, y teniendo en cuenta el camino de máximo ascenso para el rendimiento de QG31, para que la variación del rendimiento de QG31 predicho a 1000 bares, 2 pases, densidad óptica de 100 UA fuera inferior al 10 %, los valores de los parámetros debían estar dentro del rango:

- DO_{600nm} de normalización de la biomasa: de 97 a 104 UA.
- Presión de lisis en disruptor: de 940 a 1051 bar.

En el caso de establecer una variación del rendimiento de QG31 inferior al 20 %, los valores de los parámetros debían estar dentro del rango:

- DO_{600nm} de normalización de la biomasa: 95 a 108 UA.
- Presión de lisis en disruptor: 872 a 1089 bar.

3.3.3. Conclusión

Tras el desarrollo de la etapa USP, quedaron establecidas las condiciones para el crecimiento de la cepa *E. coli* LBP FTO-pJ411_QG31, expresión de QG31 y lisado celular. Los valores óptimos de los parámetros críticos de proceso y el rango de trabajo de los mismos fueron:

- Temperatura de crecimiento del cultivo: 37 °C
- Inducción de la expresión de QG31: 0.6 mM IPTG
- Velocidad de crecimiento en la fase discontinua: $\mu = 0.2 \pm 0.02 \text{ h}^{-1}$
- Densidad óptica de inducción = $75 \pm 5 \text{ UA}$
- Lisado: 2 pases a $1000 \pm 50 \text{ bar}$ a una densidad óptica de $100 \pm 3 \text{ UA}$

3.4. DESARROLLO DEL PROCESO DE PURIFICACIÓN DE QG31 (DSP)

En la primera fase de desarrollo se detectaron mediante SDS-PAGE y Western blot impurezas de producto (variantes de tamaño) de dos tipos:

- contaminantes de bajo peso molecular, de menor tamaño que QG31 que podrían ser posibles proteínas truncadas o productos de degradación
- contaminantes de alto peso molecular, que podrían ser dímeros u oligómeros de QG31

Durante la primera fase de desarrollo también se pudo apreciar que:

- el rendimiento de la primera etapa cromatográfica (intercambio iónico) era especialmente bajo (13 %)
- la concentración de endotoxinas en el producto terminado todavía era bastante elevada (del orden de $2 \times 10^5 \text{ EU/mL}$), incompatible con los requerimientos para una vacuna de aplicación intradérmica

Los objetivos principales en el desarrollo de la etapa DSP fueron:

- aumentar el rendimiento de la primera etapa cromatográfica
- disminuir las variantes de tamaño
- disminuir la concentración de endotoxinas
- desarrollar un proceso eficaz, robusto y reproducible

3.4.1. Primera etapa cromatográfica: AEX

3.4.1.1. Selección de resina mediante el uso de metodología *High-throughput screening*: Placas Predictor

Como ya se ha comentado anteriormente, en la primera etapa cromatográfica de la primera fase desarrollo se obtuvo un bajo rendimiento. El rendimiento relativo (calculado como los mg de QG31 obtenidos en la elución respecto a los mg de QG31 introducidos) de esta etapa de intercambio iónico en la que se utilizó la resina **HiTrap Q HP de 5 mL** fue de 13 % y la cantidad de QG31 eluida por mL de resina cromatográfica fue de 3.5 mg QG31. Se consideró que este bajo rendimiento debía ser aumentado y por ello, se decidió analizar la capacidad de diferentes resinas de intercambio iónico para la primera etapa de purificación cromatográfica.

El objetivo de este desarrollo fue aumentar el porcentaje de QG31 que se une a la resina cromatográfica de intercambio iónico para maximizar el rendimiento de esta etapa o unidad de proceso.

Para identificar una resina que proporcionase un alto rendimiento combinado con un elevado grado de purificación, empleando el menor tiempo y el menor volumen de muestra de partida, se utilizaron las placas Predictor (GE Healthcare).

Las placas Predictor son placas de 96 pocillos en las que cada pocillo contiene resina cromatográfica diferente sobre un filtro, de forma que emula el comportamiento de una columna cromatográfica, permitiendo analizar multitud de condiciones en un único soporte al mismo tiempo y reducir el tiempo de experimentación.

Se emplearon dos tipos de placas Predictor, una con 3 resinas CEX de intercambio catiónico (Capto S, Capto MMC, SP Sepharose Fast Flow), y la segunda con 4 resinas AEX de intercambio aniónico (Capto Q, Capto DEAE, Q Sepharose Fast Flow y Capto adhere).

Se preseleccionaron como sustancias tamponadoras: acetato sódico, citrato sódico, carbonato sódico, fosfato sódico y Tris-HCl. Se midió la conductividad de dichos compuestos en los rangos de pH 4-7 (para resinas CEX) y pH 6-9 (para resinas AEX) ya que su efectividad depende de su baja contribución a la conductividad global. Se comprobó que, excepto el Tris-HCl que cubría su rango de pH con una conductividad inferior a 4 mS/cm, el resto de sustancias tamponadoras lo cubría con una conductividad inferior a 2 mS/cm, por lo que no se descartó ninguna de las sustancias tamponadoras preseleccionadas.

Se siguieron los siguientes esquemas de trabajo para realizar los ensayos en placas Predictor: Figura 3.37 para las placas Predictor de intercambio catiónico (CEX) y Figura 3.38 para las placas Predictor de intercambio aniónico (AEX).

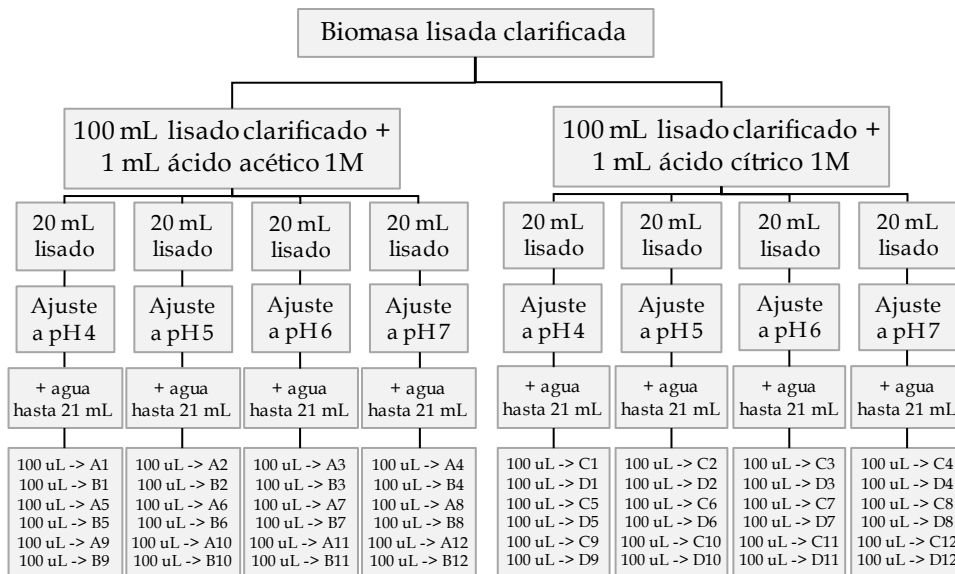


Figura 3.28. Esquema de trabajo para las placas Predictor de intercambio catiónico (CEX). En los recuadros inferiores, el código de una letra y un número hace referencia al pocillo (número de fila y número de columna) de la placa Predictor en el que se añade dicha muestra.

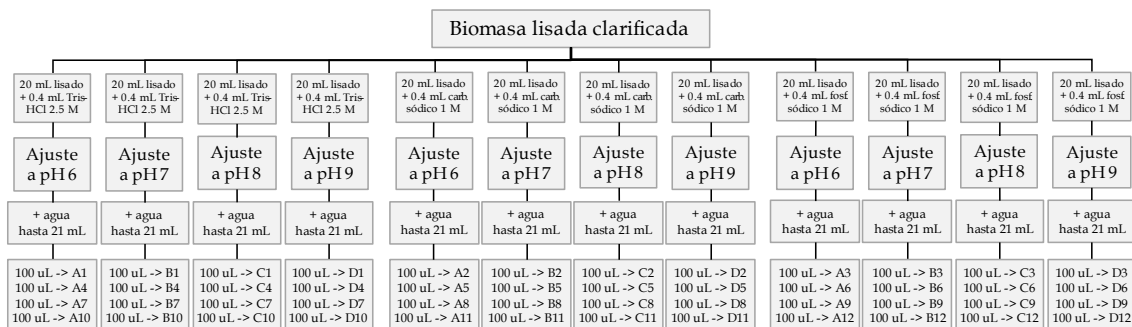


Figura 3.29. Esquema de trabajo para las placas Predictor de intercambio aniónico (AEX). En los recuadros rosas se anota el código interno de muestra. En los recuadros inferiores, el código de una letra y un número hace referencia al pocillo (número de fila y número de columna) de la placa Predictor en el que se añade dicha muestra.

Durante la ejecución del ensayo con las resinas CEX se observó precipitación del lisado bacteriano a pH 4 y 5, dificultando el filtrado del sistema, lo que impidió obtener conclusiones del experimento con este tipo de resinas. Se decidió descartar este tipo de resinas de intercambio catiónico para los siguientes pasos de desarrollo.

Para las resinas AEX, no se observó precipitado y, una vez que se aplicó lisado bacteriano a las diferentes resinas de la placa Predictor y se eluyeron las proteínas adheridas a la resina por medio de la adición de NaCl. El material eluido se analizó mediante Bradford y SDS-PAGE, midiendo la recuperación de QG31 y el factor de purificación de QG31 (Figura 3.39).

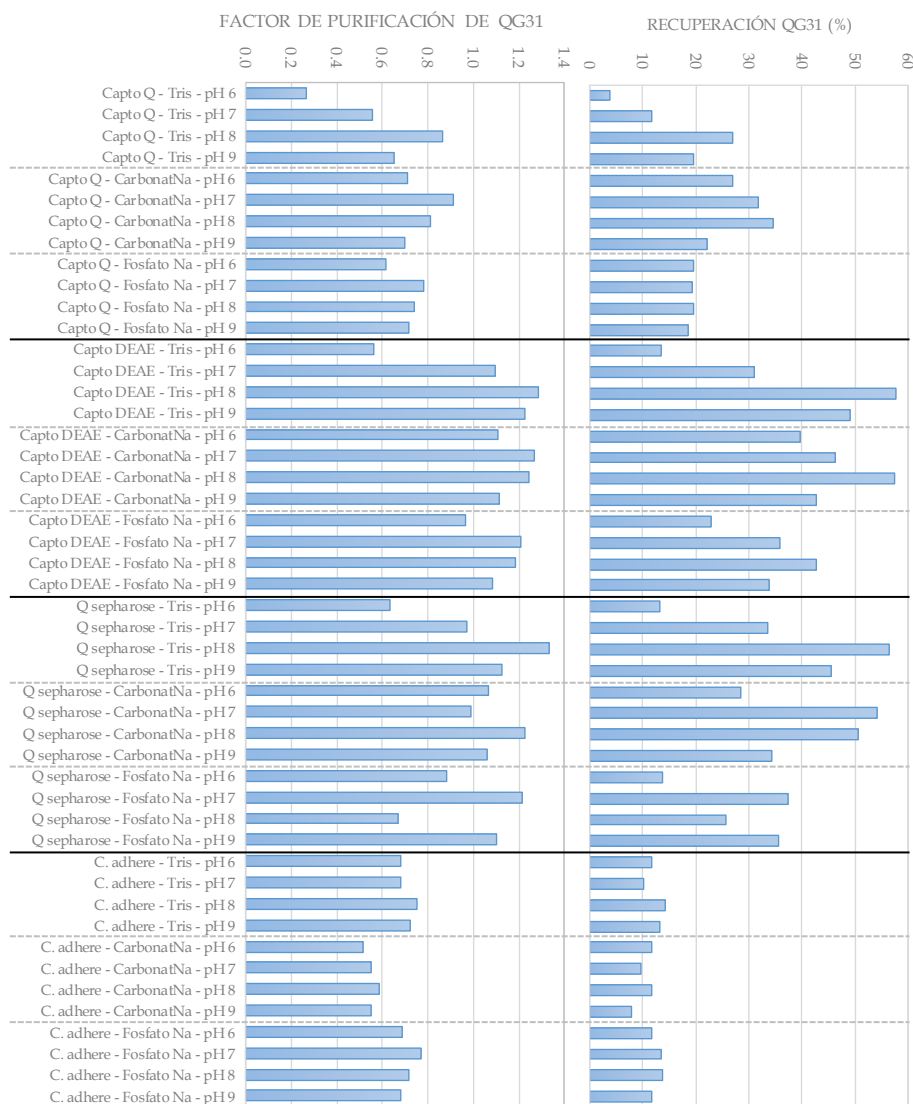


Figura 3.30. Factor de purificación (panel izquierdo) y recuperación de QG31 (panel derecho) en diferentes tampones (Tris, carbonato, fosfato) y pH (6, 7, 8, 9) estudiados para las resinas Capto Q, Capto DEAE, Q sepharose FF y Capto Adhere.

De los experimentos en placas Predictor no se pudo seleccionar una única resina que destacase sobre el resto en rendimiento y/o en grado de purificación de QG31, pero sí se pudo concluir que las resinas y condiciones más prometedoras fueron:

- Capto DEAE, en los tampones Tris y carbonato a pH 7 y 8.
- Q sepharose FF, en los tampones Tris y carbonato a pH 8.

Tomados en conjunto todos los resultados del análisis de las placas predictor se decidió continuar con las resinas Capto DEAE y Q sepharose Fast Flow y evaluarlas en otro sistema (cromatografía líquida y columnas HiScreen (GE Healthcare), de 4.7 mL de volumen y 10 cm de altura) en las condiciones:

- Tampón carbonato a pH 7
- Tampón carbonato a pH 8
- Tampón Tris-HCl a pH 8

3.4.1.2. Determinación de la carga máxima de lisado bacteriano a resina AEX

En primer lugar, se evaluó la capacidad de las resinas Capto DEAE y Q sepharose FF de unir QG31 en los tampones y a los pH anteriormente fijados mediante:

- Un sistema cromatográfico (AKTA) que permite una elevada reproducibilidad
- Columnas HiScreen, de 4.7 mL de volumen de resina, que requieren la aplicación de una reducida cantidad de muestra.
- Un flujo lineal de 1.2 ml/min compatible con un posterior escalado.

La carga máxima de una resina (expresada en volumen) indica la máxima cantidad de volumen, y por tanto miligramos, de la proteína de interés que se puede cargar en una resina hasta que todos los centros de unión de ésta se saturan y lo inyectado comienza a perderse en el *flow-through* o muestra no adsorbida (fracción de la cromatografía que sale de la columna al introducir la muestra en la misma y que no se une a la resina). Habitualmente se suele inyectar en las columnas un 80 % de la carga máxima para no alcanzar la carga máxima y aumentar la robustez y reproducibilidad de la cromatografía.

Se realizaron 6 cromatografías (dos tipos de resinas en las que estudiaron 3 tampones diferentes) inyectando 60 mL de lisado clarificado en cada ensayo. La evaluación de dichas cromatografías se muestra en la Figura 3.40.

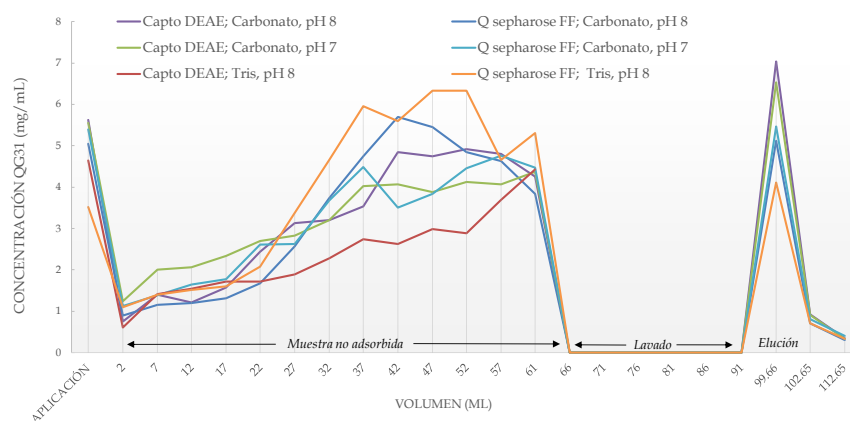


Figura 3.31. Concentración de QG31 en las cromatografías ejecutadas en columna HiScreen Capto DEAE y HiScreen Q sepharose Fast Flow. Cada color representa una condición experimental (un tampón a un pH determinado). La concentración de QG31 se calcula a partir de la concentración de proteína total y la pureza de QG31 determinada mediante densitometría en geles SDS-PAGE reductores.

Para cada experimento, la biomasa (obtenida en biorreactor) fue resuspendida en el tampón correspondiente (Tris-HCl o carbonato) hasta una DO_{600nm} de 100 UA, lisada en disruptor celular (2 pases a 1000 bares), y clarificada por centrifugación (13 000 xg a 5 °C durante 30 minutos) y por filtración (2 μ m y 0.5-0.2 μ m).

Los ensayos de captura de lisado a las resinas Capto DEAE y Q sepharose Fast Flow se realizaron en columnas HiScreen de 4.7 mL a un flujo volumétrico de 1.2 mL/min (equivalente a un flujo lineal de 150 cm/h). Se recolectaron fracciones de 1 mL y se analizaron por Bradford y SDS-PAGE reductor volúmenes discretos cada 5 fracciones.

A partir de estos experimentos, y durante el desarrollo del proceso de purificación, de las fracciones seleccionadas (identificadas en los cromatogramas en color azul) se analizó, si no se especifica lo contrario:

- Bradford, para cuantificar proteína total.

- SDS-PAGE (12.5 % acrilamida, en condiciones reductoras), para medir la pureza de QG31 (mediante densitometría con el software GeneTools).
- Concentración de QG31 en cada fracción individual (a partir de la concentración en proteína total y la pureza en QG31)
- SDS-PAGE (8 % acrilamida, en condiciones no reductoras), para estudiar las variantes de alto y bajo peso molecular de QG31

La carga máxima para cada resina en cada condición experimental se determinó identificando la fracción en la que empezaba a aumentar notablemente la cantidad de QG31 que se detectaba en el *flow-through* (análisis mediante SDS-PAGE y Bradford, resultados no mostrados). En la Tabla 3.55 se muestra la carga máxima para cada condición.

Tabla 3.55. Carga máxima para las columnas HiScreen Capto DEAE y HiScreen Q sepharose Fast Flow utilizando los tampones 10 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM carbonato sódico, pH 8 y 10 mM carbonato sódico, pH 7.

| Columna | Tampón | Volumen máx. lisado (mL) | 80% del volumen máx. lisado (mL) |
|--------------------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| HiScreen Capto DEAE | 10 mM Tris-HCl, pH 8 | 32 | 26 |
| | 10 mM carbonato sódico, pH 8 | 22 | 18 |
| | 10 mM carbonato sódico, pH 7 | 22 | 18 |
| HiScreen Q sepharose Fast Flow | 10 mM Tris-HCl, pH 8 | 22 | 18 |
| | 10 mM carbonato sódico, pH 8 | 22 | 18 |
| | 10 mM carbonato sódico, pH 7 | 17 | 14 |

Las condiciones en las que más QG31 fue capturado para cada resina fueron:

- HiScreen Capto DEAE con 10 mM Tris-HCl, pH 8
- HiScreen Q sepharose Fast Flow con 10 mM carbonato sódico pH 8

Puesto que una elevada unión de ligando no está relacionada con la pureza relativa que se alcanzará en la elución de dicho ligando, se decidió analizar en qué condición se recuperaba la mayor cantidad de QG31 con una pureza elevada. En los experimentos sucesivos, siempre se inyectó una cantidad de lisado correspondiente al 80 % de la carga máxima, de cara a ejecutar eluciones siempre en condiciones no saturantes, facilitando la reproducibilidad y fiabilidad de los distintos análisis.

3.4.1.3. Estudio del gradiente lineal para la selección de resina AEX

En los primeros experimentos de elución se observó que en el caso de la columna HiScreen Capto DEAE con tampón Tris-HCl, pH 8.0, las fracciones de mayor pureza se comenzaron a recolectar a partir de la conductividad 5.50 mS/cm. Dado que la aplicación presentaba una conductividad equivalente, y que en el *flow-through* (muestra no adsorbida) se detectaba la presencia de cantidades significativas de QG31, se decidió bajar la conductividad de la aplicación mediante dilución del lisado clarificado a la mitad, utilizando para ello el tampón de equilibrado de la columna.

Se estudió el gradiente de elución de QG31 por intercambio iónico en las condiciones:

- Columna HiScreen Capto DEAE en tampón Tris-HCl, pH 8 aplicando lisado clarificado (normalizado a $DO_{600nm} = 100$ UA) diluido $\frac{1}{2}$ en el mismo tampón (Figura 3.41, panel superior)

- Columna HiScreen Q sepharose Fast Flow en tampón carbonato sódico pH 8 aplicando lisado clarificado (normalizado a $DO_{600nm} = 100$ UA) diluido $\frac{1}{2}$ en el mismo tampón (Figura 3.41, panel inferior)

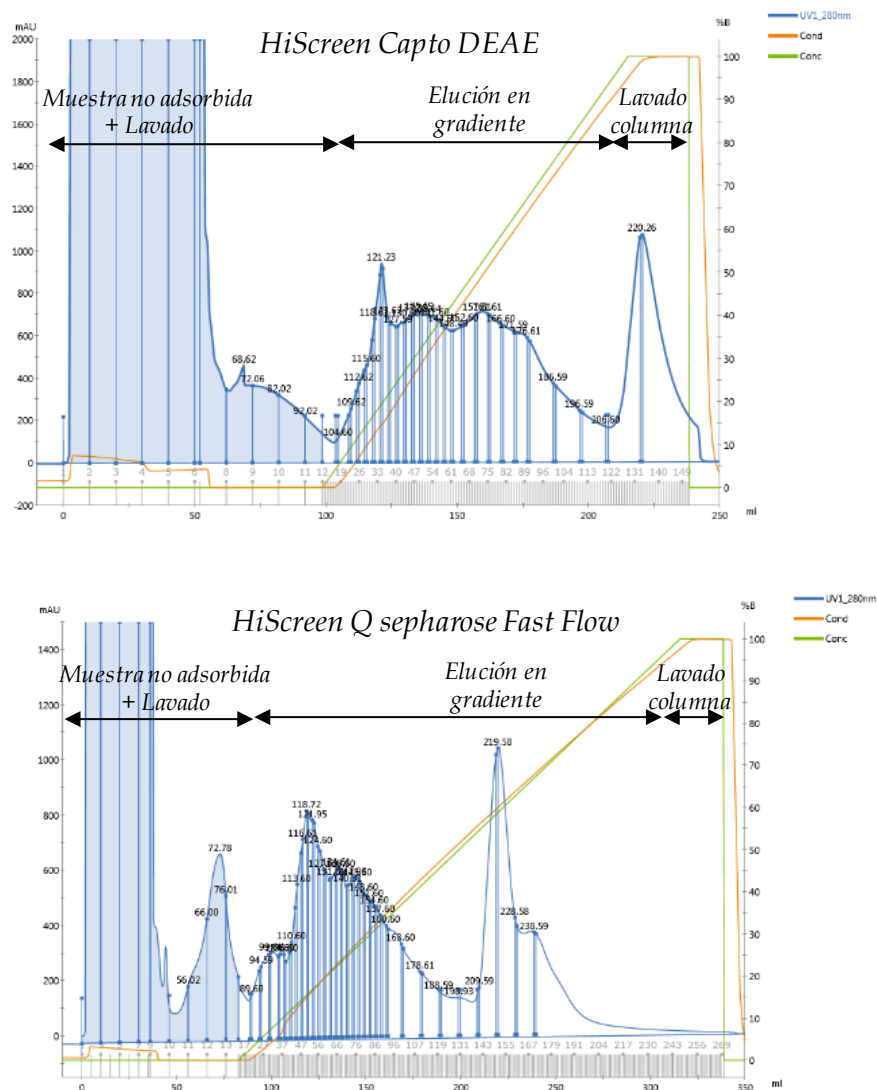


Figura 3.32. Detalle del perfil de elución en gradiente de la cromatografía de intercambio iónico. Panel superior: columna HiScreen Cpto DEAE (4.7 mL). Panel inferior: columna HiScreen Q sepharose Fast Flow (4.7 mL). Tampón A: 20 mM Tris-HCl, pH 8 y B: 20 mM Tris-HCl, 1M NaCl, pH 8. Se aplicaron 52 mL de lisado clarificado diluido $\frac{1}{2}$ con tampón A. En rectángulos verticales azules se indican las fracciones analizadas.

Se representó la pureza y concentración de QG31 para las fracciones seleccionadas de las diferentes fases de las cromatografías realizadas en las columnas HiScreen Cpto DEAE (Figura 3.42, panel superior) y HiScreen Q sepharose FF (Figura 3.42, panel inferior).

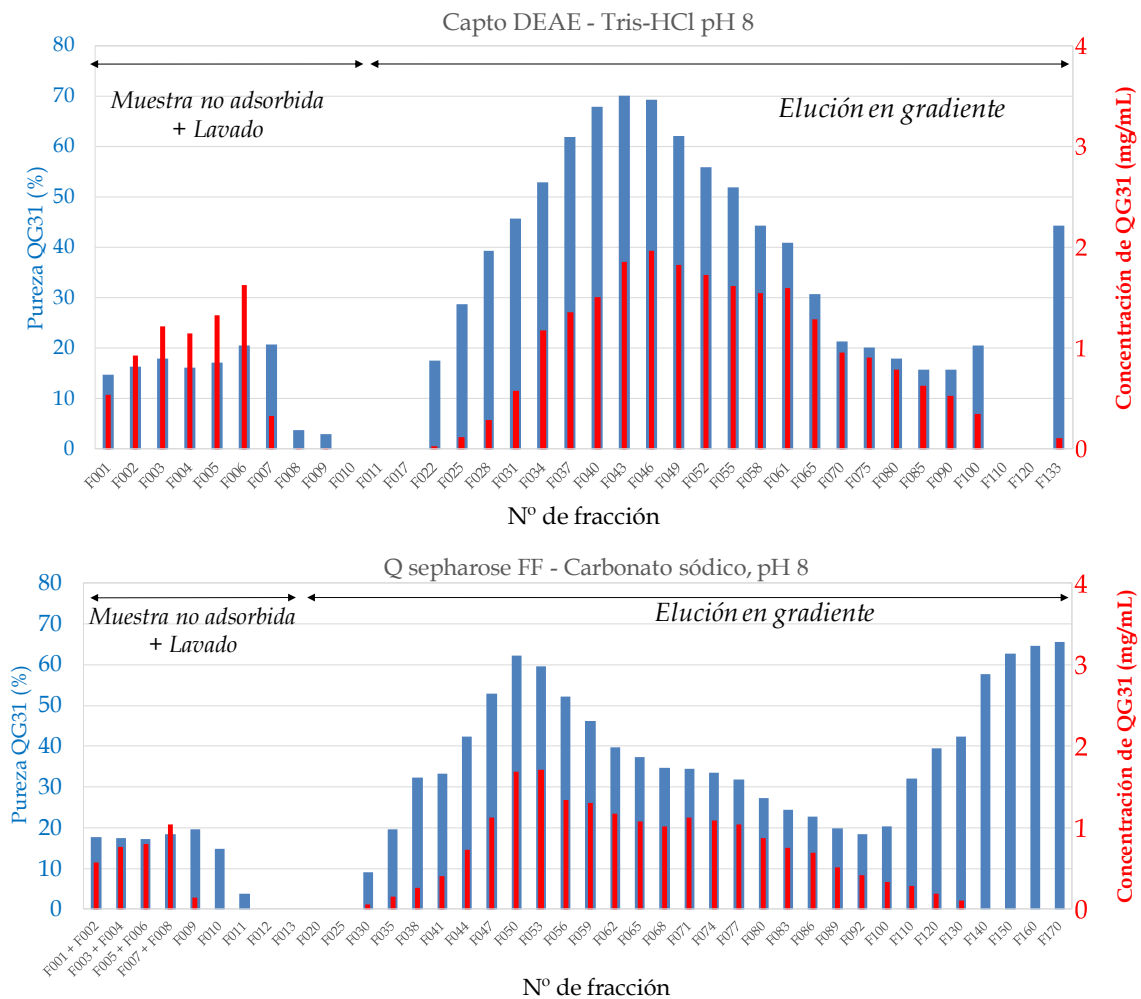


Figura 3.33. Análisis de las fracciones recolectadas de la cromatografía de intercambio iónico en columna HiScreen Capto DEAE en tampón Tris-HCl, pH 8 (panel superior) y HiScreen Q sepharose FF en tampón carbonato sódico, pH 8 (panel inferior). Las barras azules representan la pureza de QG31 (%) analizada mediante SDS-PAGE, 12.5 % acrilamida (eje izquierdo de abscisas) y las barras rojas representan la concentración de QG31 (mg/mL) (eje derecho de abscisas).

Las fracciones con una pureza superior al 50 % constituyeron el producto intermedio AEX (fracción de la elución que continuaría a la siguiente fase de purificación), y se seleccionaron dichas fracciones para analizar el rendimiento de los gradientes de elución de QG31 por intercambio iónico en cada condición analizada. En la Tabla 3.56 se muestran los resultados de este análisis.

Tabla 3.56. Rendimiento de QG31 en las condiciones experimentales testadas en gradiente lineal (cromatografía AEX).

| | HiScreen CaptoDEAE (Tris-HCl, pH 8) | HiScreen Q sepharose FF (carbonato sódico, pH 8) |
|--|--|---|
| Cantidad de QG31 aplicado (mg) | 224 | 149.2 |
| Conductividad de las fracciones con pureza QG31 >50% | De 7.28 a 16.03 | De 12.48 a 16.48 |
| Cantidad de QG31 (con pureza >50 %) (mg) | 37.4 | 17.6 |
| Rendimiento (%) (porcentaje de QG31 eluido con una pureza mayor del 50% respecto a la cantidad aplicada) | 16.7 | 11.8 |
| mg QG31/ mL resina | 7.9 | 3.7 |

Teniendo en cuenta que en la primera fase de desarrollo (apartado 3.2) se obtuvieron 3.5 mg QG31 por mL de resina, se observó que la resina CptoDEAE (en tampón Tris-HCl, pH 8) incrementaba un 126 % y la resina Q sepharose FF (en tampón carbonato sódico) un 5.7 % la cantidad de QG31 eluida por mL de resina cromatográfica.

El análisis de las cromatografías permitió definir las condiciones idóneas para la primera etapa de purificación de QG31:

- Resina: Cpto DEAE
- Tampón: 10 mM Tris-HCl
- pH: 8

3.4.1.4. Desarrollo de las etapas de lavado y elución

a) Número de volúmenes de columna (CV) de la etapa de lavado

En base al análisis del gradiente de elución en columna HiScreen Cpto DEAE con tampón Tris-HCl, pH 8 se observó que QG31 comenzaba a eluir con una pureza superior al 50 % a una conductividad de 7 mS/cm. En las fracciones anteriores a la elución de QG31 con esta pureza se observaron formas de menor peso molecular que QG31 (Figura 3.43), cuyo porcentaje disminuía en las fracciones en las que la pureza de QG31 era superior al 50 % (bandas 1 a 5, Figura 3.43) además de otras formas cuyo porcentaje aumentaba. De las bandas cuyo porcentaje aumentaba se tratará en los apartados 3.5.1.4 y 3.5.1.5.

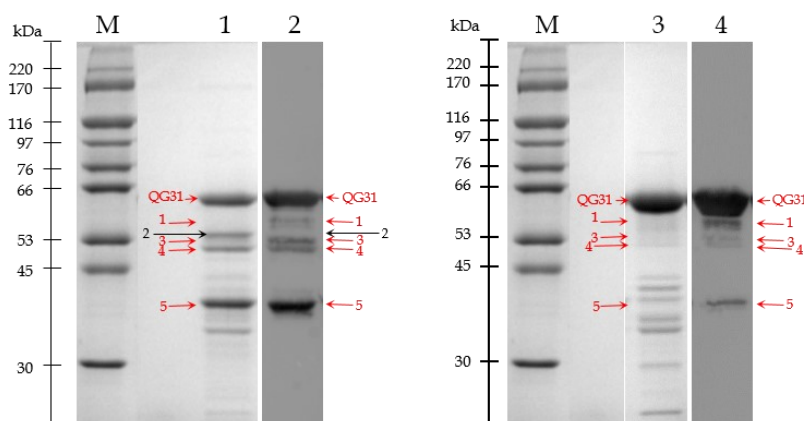


Figura 3.34. Análisis de las formas truncadas/degradadas de QG31 mediante SDS-PAGE y Western blot. Geles al 8 % de acrilamida en condiciones reductoras en fracciones antes (panel izquierdo) y después (panel derecho) del comienzo de elución de QG31 con una pureza superior al 50 %. M: marcador de peso molecular. Panel izquierdo: SDS-PAGE (calle 1) y Western blot (calle 2) de muestra de elución del gradiente con pureza de 28 %. Las flechas rojas indican la posición de formas truncadas/degradadas de QG31 y la flecha negra indica la posición de una banda contaminante (de *E. coli*) ya que no es detectada por el anticuerpo en Western blot. Panel derecho: SDS-PAGE (calle 3) y Western blot (calle 4) de muestra de elución en gradiente con pureza de 68 %.

Para minimizar la contribución de las formas truncadas/degradadas de QG31 cuyo porcentaje disminuía al aumentar la pureza de QG31, así como otras proteínas intrínsecas de *E. coli*, se diseñó una etapa de lavado en *step* (concentración fija de eluyente) con una conductividad inferior a 7 mS/cm, que es la conductividad a partir de la cual la pureza de QG31 era superior al 50 %. Se decidió fijar la conductividad de esta etapa en 5 mS/cm y se evaluó qué número de volúmenes de columna era el adecuado para alcanzar dicho objetivo. Se analizaron 1 CV y 4 CV de etapa de lavado.

Tras analizar mediante Bradford el contenido en proteína total de cada fracción, y mediante densitometría de geles SDS-PAGE el porcentaje de QG31 en la fracción proteica (datos no mostrados), se concluyó que tras ambas etapas de lavado:

- El porcentaje de pureza de QG31 todavía era inferior a 50 % en las primeras fracciones del gradiente de elución (en ambas condiciones).
- El grado de eliminación de formas truncadas de QG31 durante la etapa de lavado fue mayor con 4 CV respecto a 1 CV (las fracciones con pureza de QG31 superior al 50 % contienen 3 veces menos formas truncadas en el caso del lavado de 4 CV respecto a 1 CV).

En base a estas conclusiones, se fijó la longitud de la etapa de lavado en 4 CV.

b) Conductividad del tampón de lavado

Una vez establecido el número de volúmenes de columna de la etapa de lavado (4 CV) de la cromatografía AEX se analizó qué conductividad del tampón de lavado minimizaba en mayor medida las formas truncadas/degradadas de QG31 y proteínas contaminantes de *E. coli* en el producto intermedio de la etapa cromatográfica AEX. Para ello, se estudiaron las siguientes conductividades del *step* de lavado (de una duración de 4 CV previo a la elución):

- 5 mS/cm
- 5.75 mS/cm
- 6.5 mS/cm

Para cada fracción analizada se calculó:

- El porcentaje de QG31, en geles al 12.5 % y 8 % de acrilamida
- El porcentaje de los contaminantes correspondientes a las formas truncadas/degradadas de QG31 en geles al 8 % acrilamida
- El porcentaje de contaminantes de *E. coli* (contaminantes de proceso) en geles al 8 % acrilamida

En cada experimento se seleccionaron las fracciones del gradiente con una pureza en QG31 superior al 50 %. Dichas fracciones se descongelaron y se mezclaron para generar productos intermedios AEX, que fueron también analizados mediante Bradford y SDS-PAGE. A partir de estos datos se calculó el balance de masas y la cantidad de contaminantes en dichos productos intermedios (Tabla 3.57).

Tabla 3.57. Resumen de los datos extraídos de las cromatografías de HiScreen CptoDEAE en las que estudia la conductividad de la etapa de lavado (5 mS/cm; 5.75 mS/cm; 6.5 mS/cm).

| | | CONDUCTIVIDAD DE LA ETAPA DE LAVADO | | |
|---|--|-------------------------------------|--------------|--------------|
| | | 5.00 mS/cm | 5.75 mS/cm | 6.50 mS/cm |
| Parámetros de la cromatografía | Conductividad Tampón Step lavado (mS/cm) | 5.00 | 5.75 | 6.50 |
| | [NaCl] (mM) en 20 mM Tris-HCl pH 8 | 38.50 | 43.98 | 50.72 |
| | CV del step de lavado | 4.00 | 4.00 | 4.00 |
| Balance de masas | Pureza QG31 (%) | 56.60 | 61.62 | 64.86 |
| | Cantidad QG31 no unido (mg) | 0.90 | 2.66 | 5.53 |
| | Cantidad QG31 >50% (mg) | 23.50 | 27.90 | 26.58 |
| Proporción de formas truncadas/degradadas de QG31 en la primera fracción tras el step de lavado | Pureza contaminantes de QG31 (%) | 37.99 | 12.81 | 5.98 |
| Cantidad de contaminantes (entre 38 kDa y QG31) en "producto intermedio AEX" (pureza QG31 >50%) | Cantidad total de formas truncadas/degradadas de QG31 (mg) | 0.94 | 0.35 | 0.23 |
| | Cantidad total de contaminantes de proceso (mg) | 2.72 | 1.58 | 1.16 |

Se concluyó que la etapa de lavado que mejores resultados generaba con una mayor pureza (64.86 %), segundo mejor rendimiento (26.58 mg QG31, sólo un 5 % inferior al mejor) y menor

cantidad de contaminantes de proceso (1.16 mg) y de producto (0.23 mg) fue el realizado con la conductividad de **6.50 mS/cm** en **4 CV**. Se primó así la calidad del producto (mayor pureza y menor presencia de contaminantes) frente al rendimiento.

c) Desarrollo de la etapa de elución de la cromatografía AEX

Una vez fijada la etapa de lavado en 4 CV con tampón con una conductividad de 6.5 mS/cm, se estudió la etapa de elución de QG31. En base a la conductividad a partir de la cual la pureza en QG31 empezaba a ser inferior al 50 % (16.5 mS/cm) (Figuras 3.42 y 3.43), se evaluaron tres conductividades (16.5, 15.0 y 13.5 mS/cm) para la etapa de elución. Asimismo, se decidió ejecutar la etapa de elución durante 8 CV y analizar volúmenes discretos para evaluar el número de volúmenes de columna idóneo.

En la Figura 3.44 se superponen los perfiles (A_{280} y conductividad) de la elución de QG31 en *step* de 8 CV y conductividades de 13.5, 15.0 y 16.5 mS/cm (en columna HiScreen Capto DEAE con tampón Tris-HCl, pH 8 y 4 CV de lavado a 6.5 mS/cm previo a la elución).

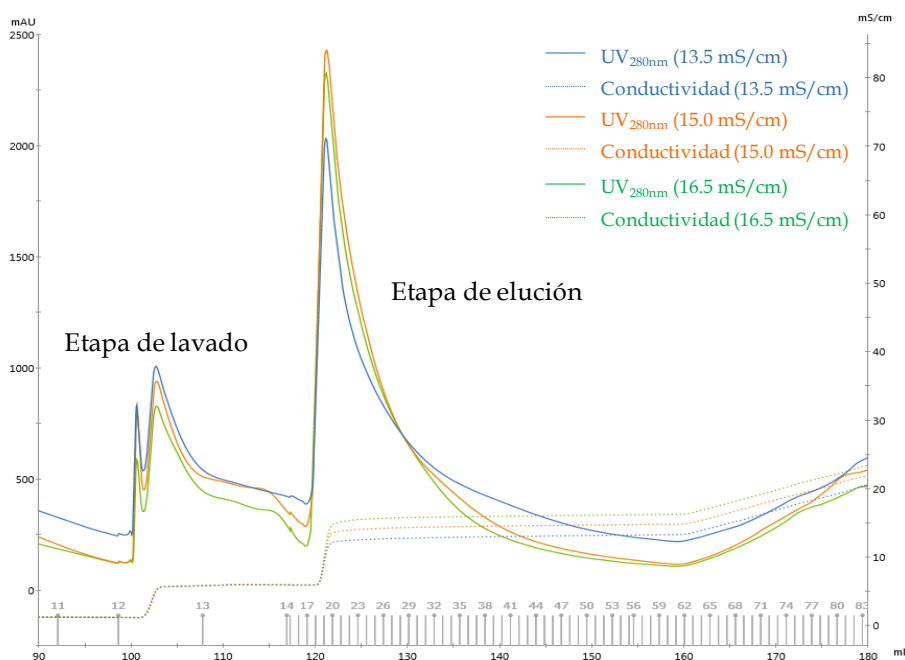


Figura 3.35. Perfiles de elución [A_{280} (línea continua) y conductividad (línea discontinua)] de la cromatografía AEX en columna HiScreen Capto DEAE con tampón Tris-HCl, pH 8. La etapa de lavado se realizó con una conductividad de 6.5 mS/cm durante 4 CV y la elución durante 8 CV con conductividades de 13.5 mS/cm (en azul), 15.0 mS/cm (en naranja) y 16.5 mS/cm (en verde).

En la Figura 3.45 se representa el análisis de las fracciones de las cromatografías de la Figura 3.44. Se muestra el porcentaje de QG31 y la cantidad de QG31 en las fracciones de cada condición experimental. En dicha Figura, el producto intermedio AEX se encuentra delimitado por la primera línea vertical discontinua (Nº de fracción 15), que señala el comienzo de la etapa de elución, y la segunda línea vertical discontinua (Nº de fracción 57), que señala el final de la etapa de elución.

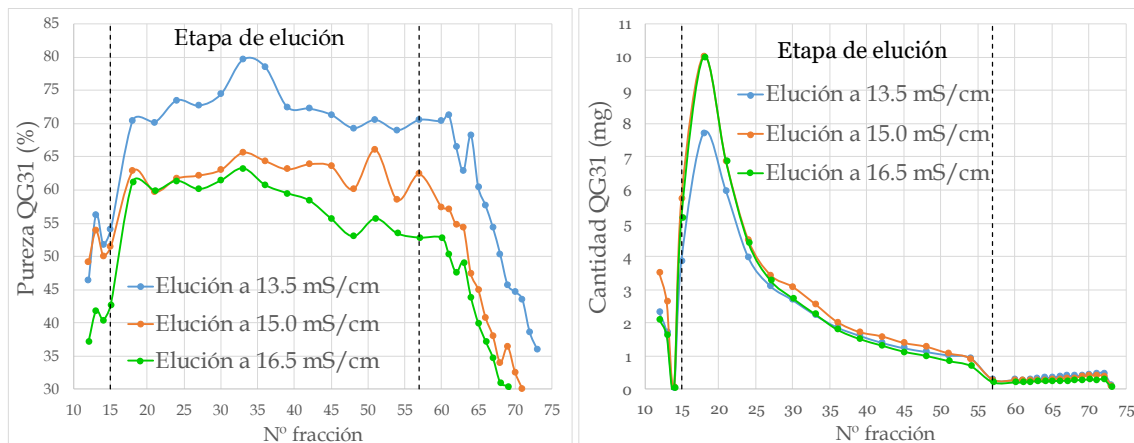


Figura 3.36. Análisis de las fracciones de la elución en *step* de la columna HiScreen CptoDEAE en 3 condiciones experimentales de conductividad. Panel izquierdo: Pureza de QG31 (expresada en porcentaje). Panel derecho: cantidad de QG31 (mg).

Se observó un aumento en la pureza de QG31 acompañado de una disminución en la cantidad de QG31 en las fracciones de la etapa de elución al disminuir la conductividad del tampón en dicha etapa.

Para cada condición se mezclaron las fracciones del gradiente de la etapa de elución para generar productos intermedios AEX, que fueron también analizados mediante Bradford y SDS-PAGE. A partir de estos datos se calcularon el balance de masas y la presencia de contaminantes (Tabla 3.58).

Tabla 3.58. Resumen del análisis de las cromatografías en HiScreen CptoDEAE. Se evalúan las conductividades para la etapa de elución: 13.5 mS/cm; 15.0 mS/cm; 16.5 mS/cm durante 8 CV.

| | | CONDUCTIVIDAD DE LA ETAPA DE ELUCIÓN | | |
|---|-------------------------------------|--------------------------------------|------------|------------|
| | | 13.5 mS/cm | 15.0 mS/cm | 16.5 mS/cm |
| Balance de masas | Pureza QG31 (%) | 76.1 | 62.6 | 58.3 |
| | Cantidad de QG31 no Unido (mg) | 13 | 16.3 | 12.5 |
| | Cantidad QG31 pureza >50% (mg) | 35.2 | 40.7 | 38.2 |
| Proporción de formas truncadas/degradadas de QG31 en la primera fracción tras la etapa de lavado | Pureza contaminantes de QG31 (%) | 1.92 | 0.43 | 1.85 |
| Proporción de contaminantes de proceso (entre 38 kDa y QG31) en las primeras fracciones tras la etapa de lavado | Pureza contaminantes de proceso (%) | 1 - 7 % | 1 - 13 % | 1 - 14 % |

Se concluyó que la etapa de elución que mejores resultados en cuanto a pureza de QG31 generaba (76.1 %, muy superior al segundo mejor caso) fue la realizada con conductividad del tampón de **13.5 mS/cm** durante **8 CV**. Se primó de nuevo la calidad del producto frente al rendimiento.

3.4.1.5. Diseño de experimentos (DoE) de la cromatografía AEX

En base a las conductividades seleccionadas para la primera etapa de purificación cromatográfica, se estudió la robustez de los valores de conductividad de las etapas de lavado y elución de la cromatografía de intercambio iónico en columna HiScreen Cpto DEAE 4.7 mL por medio del diseño de experimentos (DoE).

Como ya se ha comentado anteriormente, el diseño de experimentos es una disciplina basada en principios estadísticos, e implica un diseño y planificación de los experimentos a ejecutar de tal forma que se obtengan parámetros medibles que puedan proporcionar conclusiones válidas y objetivas a partir de un número reducido de experimentos.

A partir de la medición de la conductividad de los cuatro tampones de lavado y elución empleados en el desarrollo de las etapas anteriores (20 mM Tris-HCl, pH 8 suplementado con NaCl hasta 6.5 mS/cm en el lavado y hasta 13.5 mS/cm en la elución) se calcularon el promedio y la desviación estándar de la molaridad del cloruro sódico para cada conductividad.

- Tampón de lavado: concentración promedio NaCl: 50.89 mM, desviación estándar: 1.14 %
- Tampón de elución: concentración promedio NaCl: 123.82 mM, desviación estándar: 2.16 %

Para determinar el valor de las condiciones a ensayar en el diseño de experimentos se utilizó el criterio de 3 veces la desviación estándar de la concentración de cloruro sódico de los tampones de la etapa de lavado y de la etapa de elución (Tabla 3.59).

Tabla 3.59. Valores de los parámetros para el diseño de experimentos para la etapa AEX.

| | [NaCl] en tampón de lavado (mM) | [NaCl] en tampón de elución (mM) |
|----------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Promedio [NaCl] (mM) (n=4) | 50.89 | 123.82 |
| Desviación Estándar | 1.14 | 2.16 |
| CV(%) | 2.2 | 1.7 |
| 3 x Desv.Estándar | 3.42 | 6.47 |
| CV (%) de 3xD.E. | 6.7 | 5.2 |

La matriz de experimentos del DoE quedaría, de este modo, como se resume en la Tabla 3.60, a partir del punto central:

- 51 mS/cm, en el caso del tampón de lavado, se ensayarán las condiciones 51 ± 4 mS/cm
- 124 mS/cm, en el caso del tampón de elución, se ensayarán las condiciones 124 ± 7 mS/cm

Tabla 3.60. Valores de la concentración de NaCl en el lavado y en la elución de cada experimento del DoE.

| Experimento DoE | [NaCl] en tampón de lavado (mM) | [NaCl] en tampón de elución (mM) |
|---------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Punto central (0,0) | 51 | 124 |
| AEX DoE 1 (-1,-1) | 47 | 117 |
| AEX DoE 2 (-1,1) | 47 | 131 |
| AEX DoE 3 (1,-1) | 55 | 117 |
| AEX DoE 4 (1,1) | 55 | 131 |

En la Figura 3.46 se muestra una superposición de los cromatogramas que se ejecutaron en base al diseño de experimentos de la cromatografía de intercambio iónico AEX.

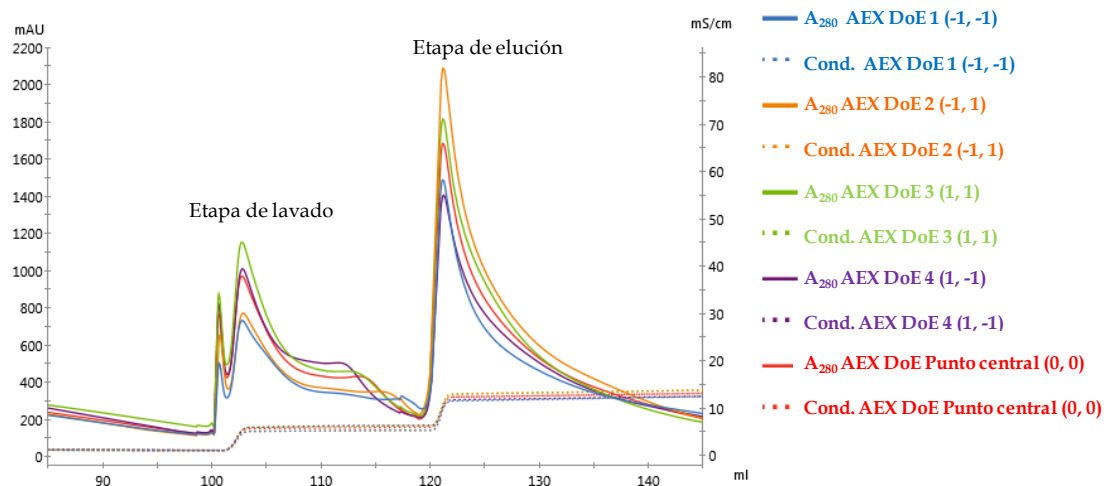


Figura 3.37. Perfiles de elución del diseño de experimentos de la cromatografía de intercambio iónico AEX.

Como en ensayos anteriores, en estos experimentos se cuantificó el contenido en proteína total por el método de Bradford y se midió la pureza de QG31 por SDS-PAGE/densitometría. Estos resultados se compararon con el control (experimento del punto central (0,0)) (Tabla 3.61).

Tabla 3.61. Concentración de proteína total (mg/mL) (Bradford) y pureza de QG31 en SDS-PAGE (12.5 % acrilamida en condiciones reductoras) en las diferentes condiciones del diseño de experimentos (DoE) de la primera etapa cromatográfica AEX.

| DESCRIPCION MUESTRA | Concentración de proteína total (mg/mL) (Bradford) | | | | | Pureza de QG31 en SDS-PAGE 12.5 % en cond. reductoras | | | | |
|---|--|------------------|-----------------|-----------------|----------------|---|------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| | Punto central DoE (0,0) | IEX DoE1 (-1,-1) | IEX DoE2 (-1,1) | IEX DoE3 (1,-1) | IEX DoE4 (1,1) | Punto central DoE (0,0) | IEX DoE1 (-1,-1) | IEX DoE2 (-1,1) | IEX DoE3 (1,-1) | IEX DoE4 (1,1) |
| Lisado clarificado (20 mM Tris-HCl, pH 8) | 19.60 | 14.93 | 18.82 | 18.63 | 18.80 | 27.35 | 32.21 | 30.73 | 28.92 | 28.39 |
| Aplicación AEX (lisado clarificado diluido 1/2 en 20 mM Tris-HCl) | 9.47 | 7.63 | 9.44 | 9.93 | 8.71 | 29.50 | 34.96 | 31.78 | 31.17 | 29.61 |
| No unido | 2.16 | 1.80 | 2.51 | 2.28 | 2.01 | 16.36 | 17.46 | 17.83 | 16.40 | 16.74 |
| Lavado | 0.44 | 0.32 | 0.39 | 0.57 | 0.52 | 42.06 | 29.58 | 39.75 | 42.97 | 41.63 |
| Producto intermedio AEX | 1.44 | 1.20 | 1.80 | 1.29 | 1.52 | 60.22 | 63.69 | 57.26 | 59.68 | 56.06 |
| Lavado columna | 2.45 | 2.21 | 2.70 | 2.70 | 2.21 | 16.32 | 17.86 | 16.53 | 17.34 | 15.96 |

A partir de la concentración de proteína total cuantificada por Bradford y la pureza de QG31 analizada por SDS-PAGE (12.5 %, en condiciones reductoras) se calculó la cantidad de QG31 en cada producto intermedio AEX. A continuación, tomando como referencia la aplicación AEX, se calculó el rendimiento de la etapa de purificación de QG31 (Figura 3.47, panel izquierdo, en naranja). Finalmente, se calculó la variación en porcentaje de la pureza de QG31 y del rendimiento de QG31 respecto al punto central del DoE (ver Figura 3.47, panel derecho).

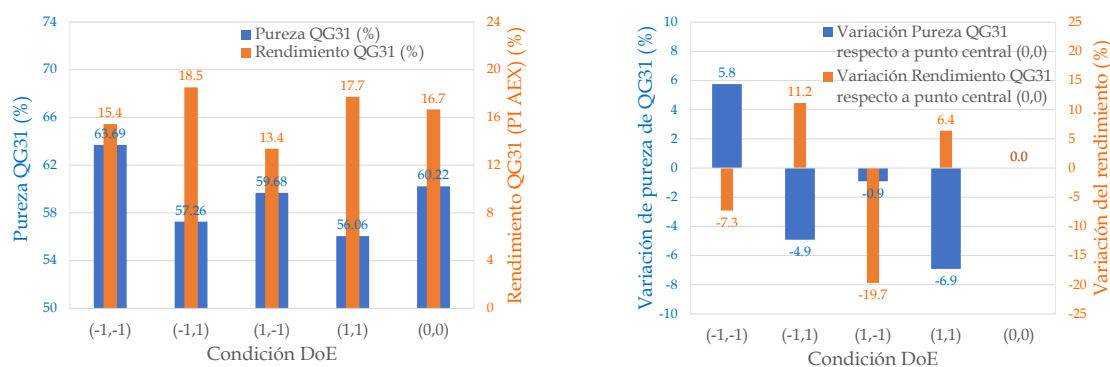


Figura 3.38. Pureza y rendimiento del DoE de la cromatografía AEX (panel A) y variación en pureza y rendimiento respecto al punto central del DoE (panel B). Las columnas azules representan la pureza de QG31 y las columnas naranjas representan el rendimiento de la etapa AEX expresada en porcentaje.

Para el producto intermedio AEX, se pudo observar que la variación en pureza de QG31 respecto al punto central fue inferior al 10 % mientras que la diferencia de rendimiento respecto al punto central fue inferior al 10 % en las condiciones (-1,-1) y (1,-1) y entre 10 y 20 % en las condiciones (-1, 1) y (1, 1).

Respecto al porcentaje de la forma monomérica de QG31 y de contaminantes de diferente peso molecular, los valores se muestran en la Tabla 3.62 (en porcentaje).

Tabla 3.62. Resumen del porcentaje de pureza de QG31 (monómero y dímero) en el diseño de experimentos de la cromatografía AEX.

| Condiciones SDS-PAGE | MUESTRA | Pureza (%) en SDS-PAGE | | | | | Variación respecto a punto central (%) | | | | |
|----------------------|-----------------|------------------------|------------------|-----------------|-----------------|----------------|--|------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| | | Punto central (0,0) | IEX DoE1 (-1,-1) | IEX DoE2 (-1,1) | IEX DoE3 (1,-1) | IEX DoE4 (1,1) | Punto central (0,0) | IEX DoE1 (-1,-1) | IEX DoE2 (-1,1) | IEX DoE3 (1,-1) | IEX DoE4 (1,1) |
| 12.5% acr. (Red.) | % Monómero QG31 | 61.4 | 63.5 | 60.9 | 63.1 | 58.3 | 0 | 3.4 | -0.8 | 2.8 | -5.1 |
| 8% acr. (No Red.) | % Monomero QG31 | 71.4 | 66.8 | 64.3 | 68.4 | 68.0 | 0 | -6.5 | -10.0 | -4.3 | -4.8 |
| | %QG31 dímero | 2.3 | 5.2 | 5.2 | 5.7 | 4.1 | 0 | 130.9 | 127.4 | 150.7 | 80.4 |

Comparando los productos intermedios AEX de las 4 condiciones del DoE y del punto central mediante Western blot en un mismo gel SDS-PAGE 8 % no reductor transferido a membrana de transferencia e incubado con anticuerpo anti-Phl p 5, tal y como se observa en la Figura 3.48, no se observan diferencias significativas en el perfil de bandas.

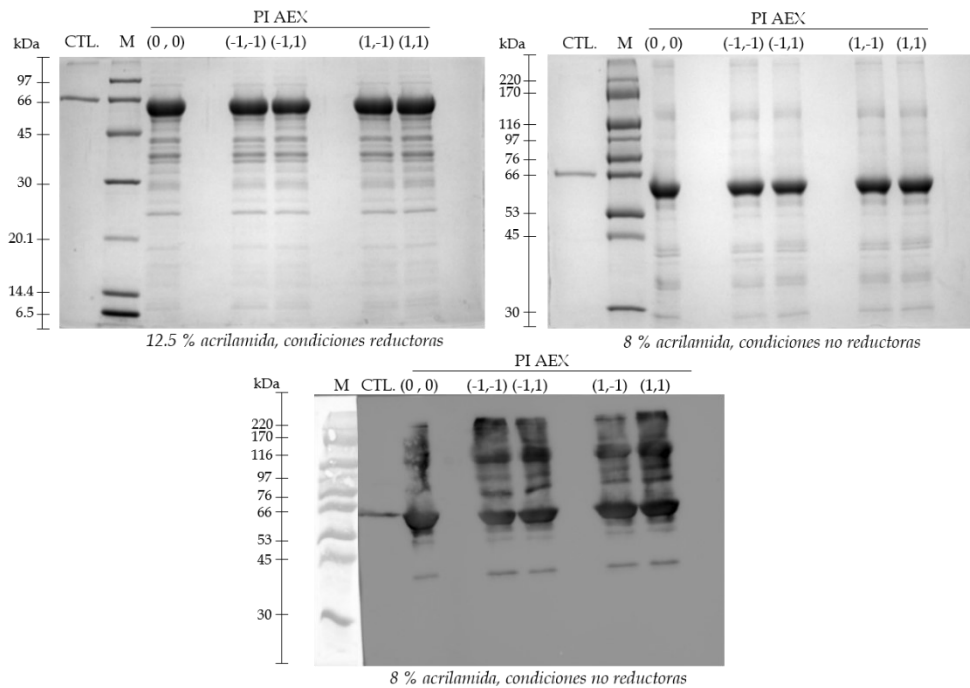


Figura 3.39. Comparación del perfil de bandas del producto intermedio AEX del diseño de experimentos de la cromatografía AEX mediante SDS-PAGE (paneles superiores) y Western blot (panel inferior). Ver Tabla 3.60 para las condiciones del DoE.

Del diseño de experimentos de la cromatografía AEX se concluyó que:

- La diferencia de pureza de QG31 en el producto intermedio AEX en las 4 condiciones ensayadas en el DoE en geles SDS-PAGE al 12.5 % acrilamida en condiciones reductoras respecto al punto central fue **inferior al 7 %**.
- La diferencia de rendimiento de QG31 en el producto intermedio AEX en las 4 condiciones ensayadas en el DoE calculado a partir de geles SDS-PAGE al 12.5 % acrilamida en condiciones reductoras y la cuantificación de proteína total por Bradford respecto al punto central fue **inferior al 7.3 %** en las condiciones (-1,-1) y (1,-1) y **entre 10 y 20 %** en las condiciones (-1, 1) y (1, 1).
- No se observaron diferencias significativas en el perfil de bandas analizadas por Western blot en las 4 condiciones del DoE respecto al punto central.

De todo ello se concluyó que la robustez de la primera etapa cromatográfica era compatible con una producción industrial.

3.4.1.6. Escalado a soporte XK26/20

Con el objetivo de escalar el proceso y obtener una mayor cantidad de producto intermedio AEX, manteniendo los flujos lineales (y con ello el mismo tiempo de residencia) empleados hasta el momento con las columnas HiScreen de 10 cm de altura, se empaquetó la misma resina (Capto DEAE) en soporte XK26/20 hasta una altura de 10 cm (lo que implica un volumen total de 53 mL, ya que el diámetro de este soporte es de 2.6 cm).

Mediante el test de empaquetado (ver apartado 2.2.3. "Empaquetado de columnas"), se obtuvo un factor de asimetría (A_s) de 0.96, cumpliéndose el criterio de aceptación de $0.8 < A_s < 1.8$, aceptándose como apto el empaquetado de la columna.

3.4.1.7. Condiciones finales para la primera etapa cromatográfica (cromatografía de intercambio iónico)

Se concluyó, por tanto, que la cromatografía de QG31 en la resina de intercambio iónico CaptoDEAE empaquetada en soporte XK26/20 hasta una altura de 10 cm se realizaría del siguiente modo:

- Aplicación de 609 mL del lisado clarificado
- Lavado de la fracción no unida con 10 CV de tampón 20 mM Tris-HCl, pH 8
- Etapa de lavado con 4 CV de tampón 20 mM Tris-HCl, 51 mM NaCl, pH 8
- Etapa de elución con 8 CV tampón 20 mM Tris-HCl, 124 mM NaCl, pH 8, que constituye el "Producto Intermedio AEX"

En estas condiciones de elución, se consiguió un producto intermedio AEX con una pureza de 64 %. El rendimiento de la etapa AEX (mg QG31 obtenidos respecto a aplicados) fue de 18.5 % y la resina consiguió captar 5.7 mg QG31/mL de resina. Teniendo en cuenta que en la primera fase de desarrollo (apartado 3.2) se obtuvieron 3.5 mg QG31 por mL de resina, con la resina Capto DEAE, en las condiciones descritas tras esta segunda fase de desarrollo, se logró incrementar la unión de QG31 un 62 %.

El producto intermedio AEX que se empleó para el desarrollo de las siguientes etapas cromatográficas se obtuvo a partir de esta columna empaquetada.

3.4.2. Desarrollo de la segunda etapa cromatográfica: HIC

La cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC, *Hydrophobic Interaction Chromatography*) separa las proteínas en base a su grado de hidrofobicidad. La unión de las proteínas a la resina hidrofóbica se favorece en condiciones de alta fuerza iónica del medio, para lo cual se suelen emplear altas concentraciones de sales como el sulfato amónico. Las sales reducen la solvatación de la muestra, lo que provoca que las regiones hidrofóbicas de las proteínas se expongan y se unan a los grupos hidrofóbicos de la resina. Para eluir las proteínas unidas, se disminuye dicha fuerza iónica reduciendo paulatinamente la concentración de la sal en uso (sulfato amónico), lo que, en caso de una reducción gradual, permitirá la separación de las diferentes proteínas según su grado de hidrofobicidad.

3.4.2.1. Selección de la resina de interacción hidrofóbica

Tras el desarrollo de la primera etapa cromatográfica de intercambio iónico en resina Capto DEAE con tampón Tris-HCl, pH 8, en la que se buscaba obtener un producto intermedio con una pureza de QG31 igual o superior al 50 %, se evaluó una segunda etapa cromatográfica con el objetivo de separar la forma monomérica de QG31 (que constituiría el producto terminado) de las formas degradadas y multiméricas de QG31, hasta una pureza superior al 90 %. Se decidió utilizar una resina hidrofóbica, puesto que durante la "Prueba de concepto" había sido utilizada satisfactoriamente, y la combinación de una resina iónica junto con una resina hidrofóbica es una combinación frecuentemente empleada por su eficacia en la purificación de proteínas ya que utiliza dos parámetros físico-químicos (punto isoelectrico e hidrofobicidad) diferentes.

Para desarrollar el segundo paso cromatográfico de purificación de QG31 se analizaron 4 resinas de interacción hidrofóbica para cubrir un amplio rango de hidrofobicidad:

- a) Capto Phenyl
- b) Phenyl Sepharose High Performance (Phenyl HP)

- c) Capto Butyl
- d) Octyl sepharose Fast Flow

En la Figura 3.49 se muestran ordenadas en base a su hidrofobicidad.

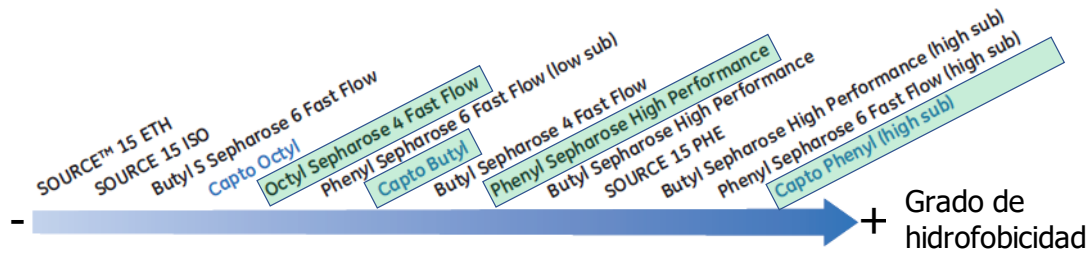


Figura 3.40. Hidrofobicidad relativa de las resinas de interacción hidrofóbica. Se marcan con un recuadro verde las resinas estudiadas. Modificado de GE Healthcare.

Para las cuatro resinas se utilizó el mismo tipo de soporte (columnas HiScreen de 10 cm de altura y 4.657 mL de resina) y se ejecutó el mismo método cromatográfico: se cargaron 100 mL de producto intermedio AEX suplementado con sulfato amónico hasta 0.5 M y, tras lavar durante 10 CV se eluyó con un gradiente lineal de 0 a 100 % B en 20 CV.

a) Resina Capto Phenyl

QG31 monomérica comenzó a eluir de la columna **HiScreen Capto Phenyl** junto con proteínas de menor peso molecular en la parte final del gradiente de elución (≈ 1 mS/cm) (Figura 3.50), y no eluyó en mayor cantidad (y lo hace junto con las formas multiméricas) hasta que no se empleó agua como tampón de elución (datos no mostrados).

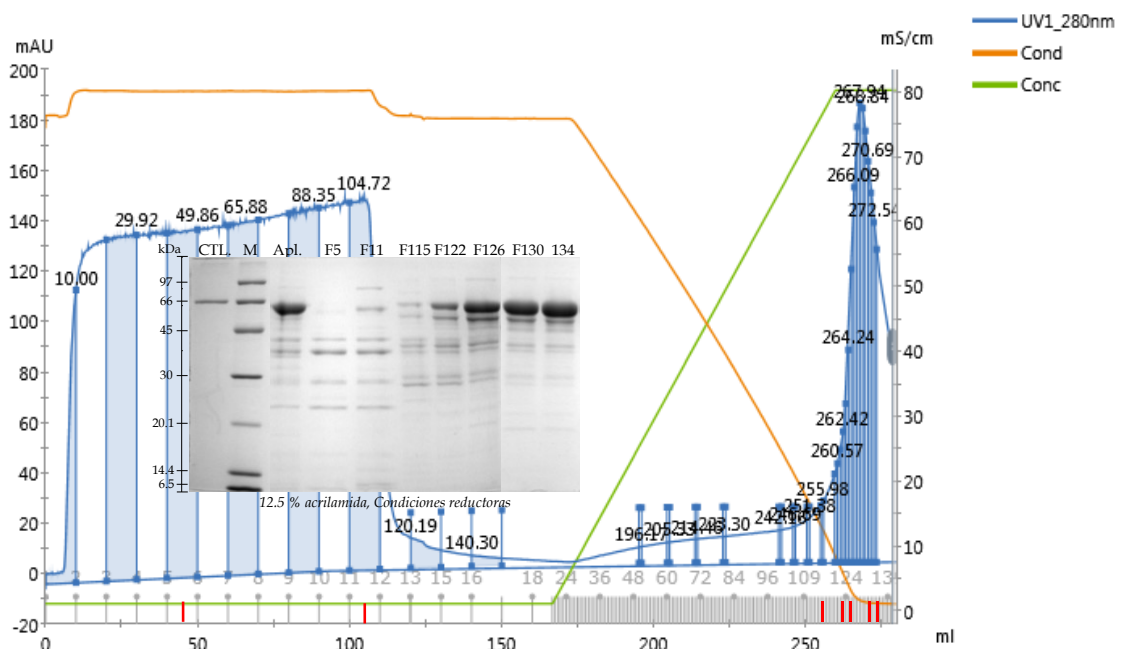


Figura 3.41. Perfil de elución de la cromatografía HIC en columna HiScreen Capto Phenyl y SDS-PAGE de fracciones de la muestra no adsorbida y la elución. Tampón A: 20 mM Tris-HCl, pH 8, 500 mM sulfato amónico. Tampón B: 5 mM Tris-HCl, pH 8. Se marcan en rojo las fracciones mostradas en el gel SDS-PAGE insertado en la figura. CTL: control. Apl.: Aplicación. M: marcadores.

La extremadamente alta afinidad de esta resina por QG31 invalidó su uso en el proceso de obtención de QG31, ya que imposibilitaba su purificación.

b) Resina Phenyl Sepharose HP

La resina **Phenyl Sepharose HP** separó QG31 monomérico de las formas multiméricas, las formas degradadas de QG31 y las impurezas de *E. coli*. En la Figura 3.51 se muestra el cromatograma con las fracciones seleccionadas para el análisis en azul. Dichas fracciones se analizaron mediante geles SDS-PAGE con porcentajes de acrilamida del 12.5 y 8 % en condiciones reductoras y no reductoras, para determinar la pureza de QG31 y las impurezas de producto QG31 y de proceso (*E. coli*) (Figura 3.52).

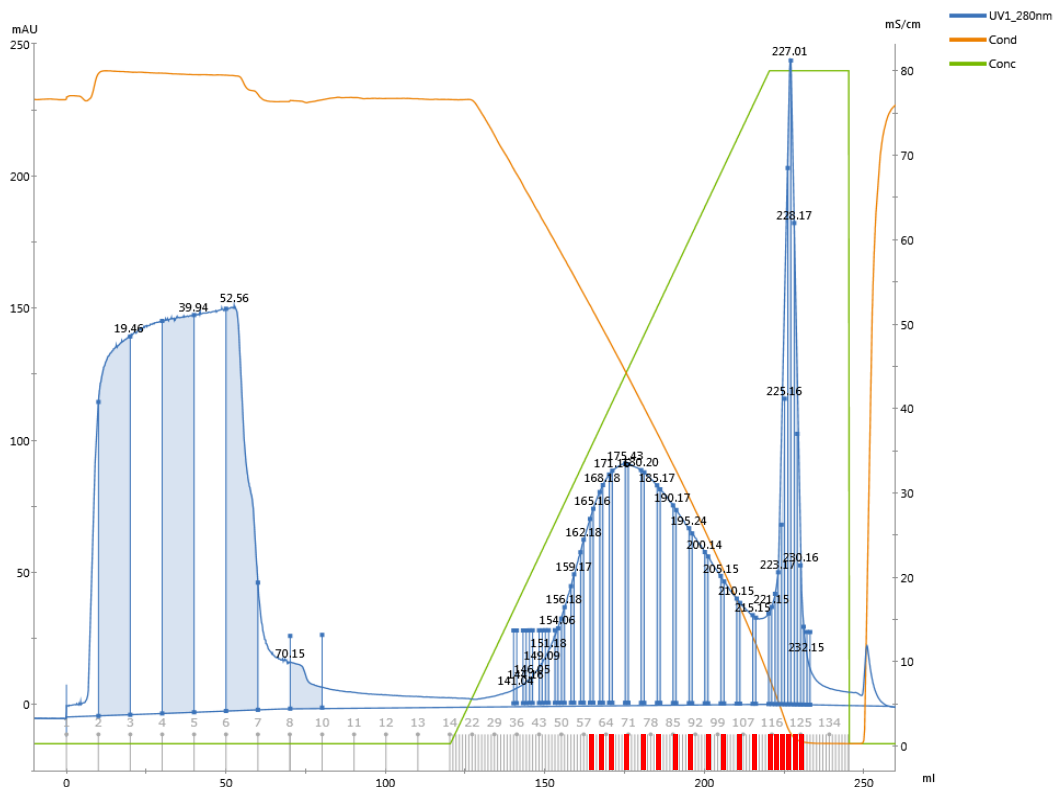


Figura 3.42. Perfil de elución de la cromatografía HIC en columna *HiScreen Phenyl Sepharose HP*. Tampón A: 20 mM Tris-HCl, pH 8, 500 mM sulfato amónico. Tampón B: 5 mM Tris-HCl, pH 8.

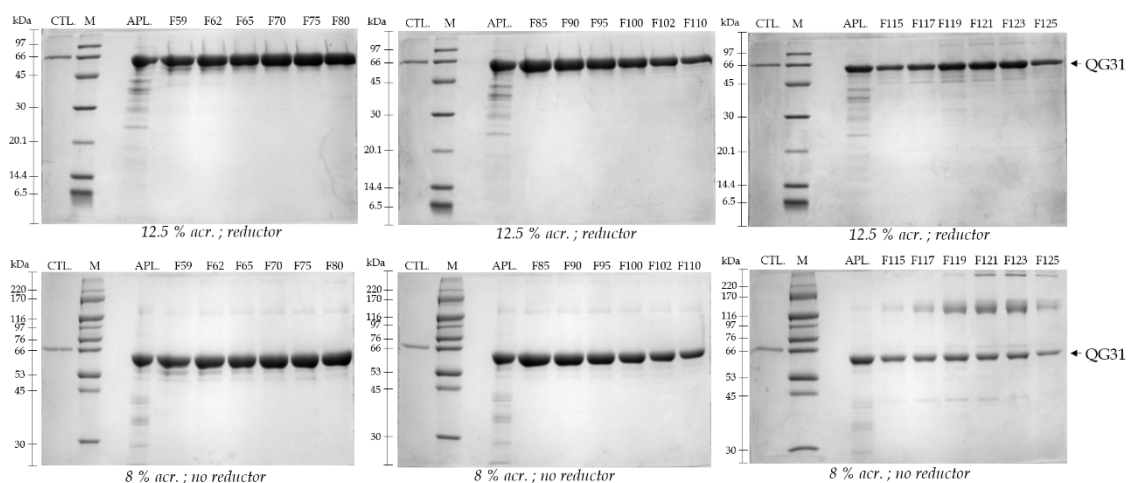


Figura 3.43. Análisis SDS-PAGE de las fracciones eluidas de la cromatografía HIC en columna *HiScreen Phenyl Sepharose HP*. CTL: control. M: marcadores. Apl.: Aplicación.

Debido a la alta capacidad de esta resina de separar QG31 del resto de contaminantes y formas multiméricas de QG31 se concluyó que la resina Phenyl Sepharose HP era una buena candidata para constituir la segunda etapa cromatográfica del proceso de purificación.

c) *Resina Capto Butyl*

El cromatograma de la cromatografía HIC con resina Capto Butyl se muestra en la Figura 3.53 donde se han insertado los gels SDS-PAGE de la etapa de elución.

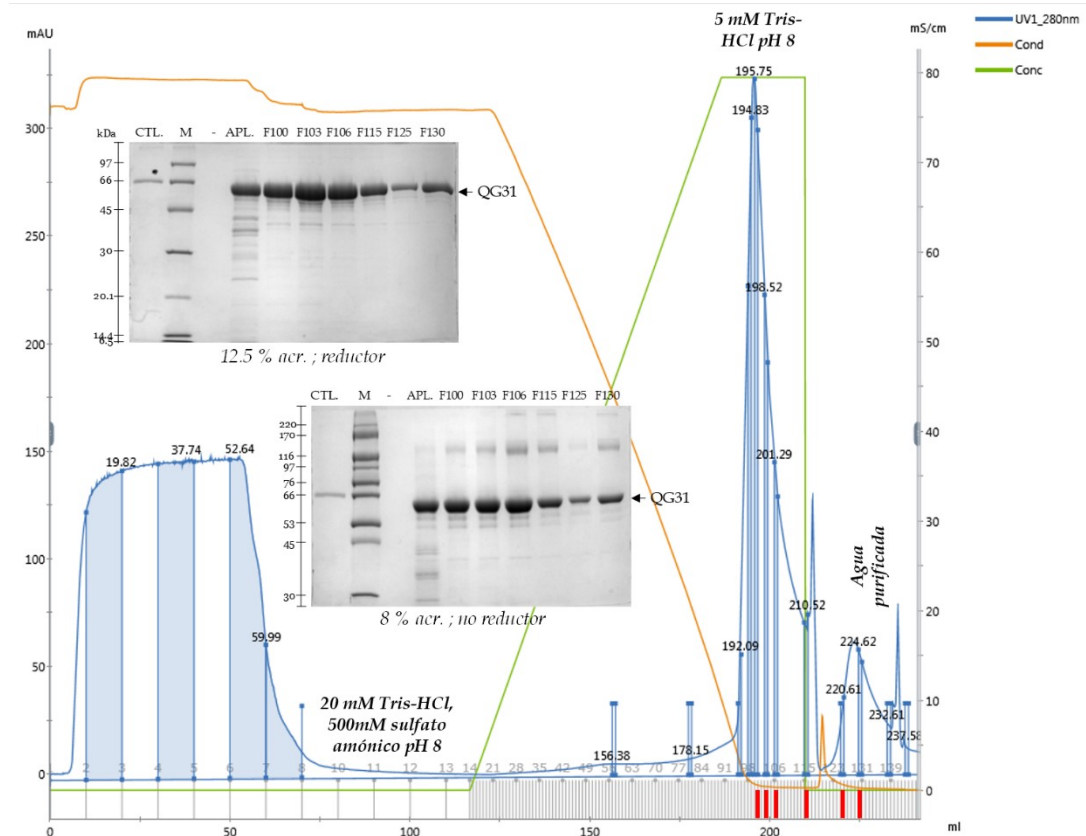


Figura 3.44. Perfil de elución de la cromatografía HIC en columna HiScreen Capto Butyl y análisis SDS-PAGE. Tampón A: 20 mM Tris-HCl, pH 8, 500 mM sulfato amónico. Tampón B: 5 mM Tris-HCl, pH 8. Tampón A': agua purificada. Las fracciones analizadas en los SDS-PAGE se muestran marcadas en el cromatograma en rojo. CTL: control. M: marcadores. Apl.: Aplicación.

La resina **Capto Butyl** no separó la forma monomérica de QG31 de las formas multiméricas, las formas degradadas de QG31 y las impurezas de *E. coli*. Además, como en el caso de la resina Capto Phenyl, se hizo necesario una elución con agua purificada para eluir toda la muestra adherida a la resina. Por todo ello, la resina **Capto Butyl** se descartó del proceso de selección de la resina HIC idónea.

d) *Resina Octyl Sepharose 4 Fast Flow (Octyl FF)*

En la Figura 3.54 se muestra la cromatografía HIC con resina Octyl FF, y el análisis de las fracciones mediante SDS-PAGE en la Figura 3.55.

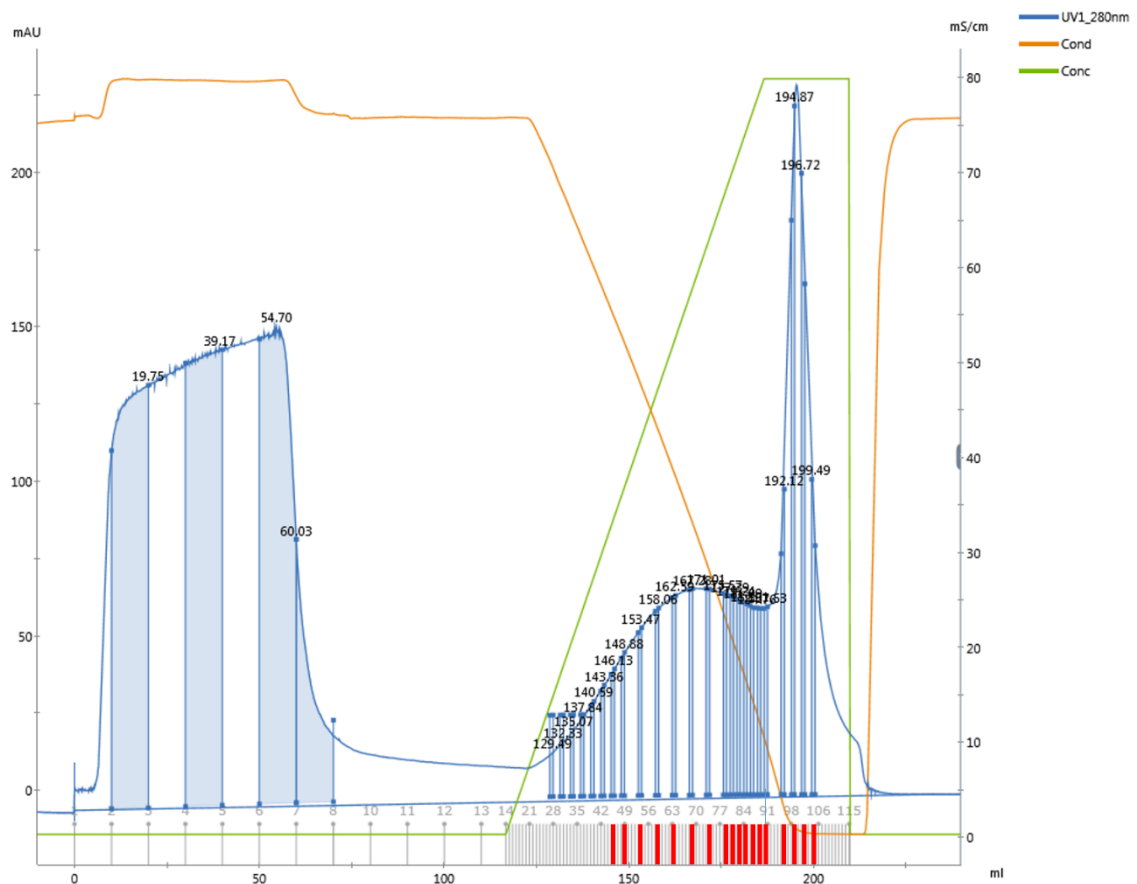


Figura 3.45. Perfil de elución de la cromatografía HIC en columna HiScreen Octyl FF. Tampón A: 20 mM Tris-HCl, pH 8, 500 mM sulfato amónico. Tampón B: 5 mM Tris-HCl, pH 8.

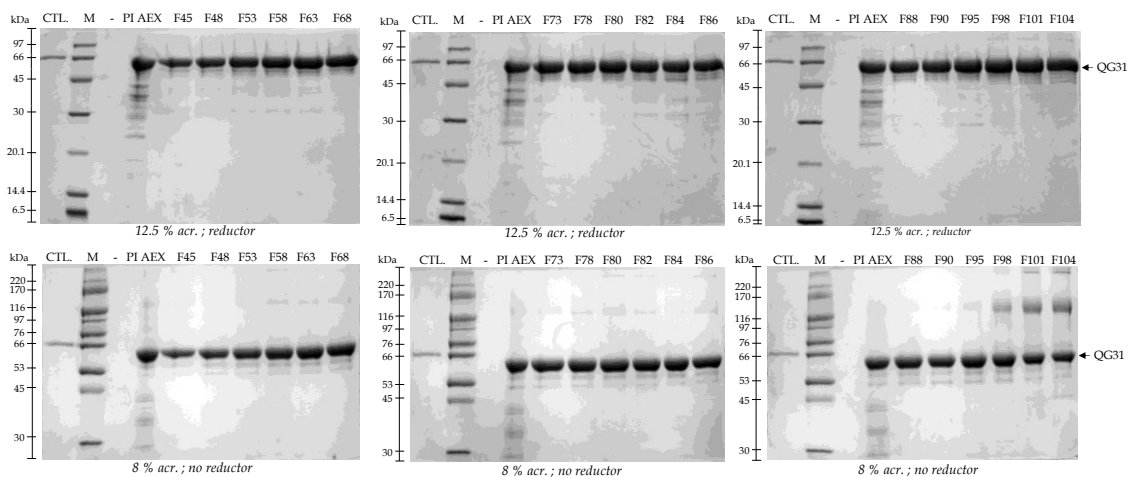


Figura 3.46. Análisis de las fracciones eluidas de la cromatografía HIC en columna HiScreen Octyl FF. CTL: control. M: marcadores. PI AEX: Producto Intermedio AEX. Apl.: Aplicación.

La resina **Octyl FF** consiguió separar QG31 monomérico y las formas multiméricas, truncadas de QG31 e impurezas de *E. coli*, por lo que se analizaron en paralelo esta resina junto con la resina Phenyl Sepharose HP, con la que también se obtuvieron buenos resultados de purificación.

e) Comparación de las resinas

Se decidió analizar más exhaustivamente las cromatografías con las resinas Phenyl Sepharose HP (Phenyl Seph. HP) y Octyl Sepharose 4 Fast Flow (Octyl FF) ya que fueron las más prometedoras a la hora de purificar QG31.

Se comparó la pureza de: QG31 (forma monomérica), dímero de QG31 e impurezas de bajo peso molecular. Las impurezas de bajo peso molecular se cuantificaron como el sumatorio de todas las bandas que se observaban en SDS-PAGE 8 % acrilamida (condiciones no reductoras) de peso molecular inferior a QG31.

Las fracciones fueron analizadas mediante densitometría en geles SDS-PAGE al 12.5 % de acrilamida en condiciones reductoras para el análisis de pureza de QG31 (forma monomérica) y en geles SDS-PAGE al 8 % de acrilamida en condiciones no reductoras para el análisis del dímero y las impurezas (Figura 3.56).

Para facilitar la interpretación de la Figura 3.56, el número de fracción se unificó empezando a contar las fracciones en ambos casos desde que se comenzaba a detectar QG31 (no siendo, por tanto, el número de fracción representativo del volumen de elución).

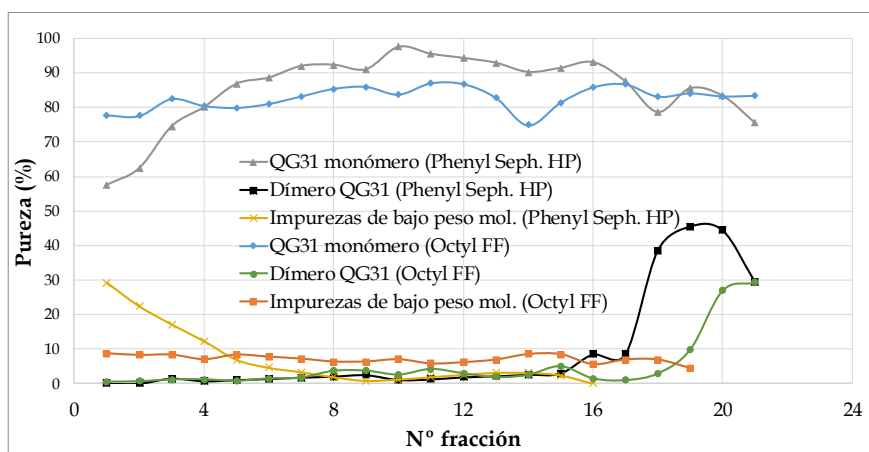


Figura 3.47 Pureza de QG31 (monómero y dímero) e impurezas de bajo peso molecular en las fracciones de la elución con resinas HIC "Phenyl Sepharose HP" y "Octyl Sepharose 4 Fast Flow" (Octyl FF).

Se concluyó que la resina *Phenyl Sepharose HP* proporcionó la mayor pureza de QG31 (un promedio de pureza de QG31 en las fracciones centrales (fracciones 4 a 16) de 91.2 % con la resina Phenyl Sepharose HP respecto a 82.9 % con la resina Octyl FF) junto con una menor proporción de impurezas (3.6 % respecto a 6.9 %), así que se decidió continuar el resto del desarrollo con la resina Phenyl Sepharose HP.

3.4.2.2. Determinación de la carga máxima de la resina HIC

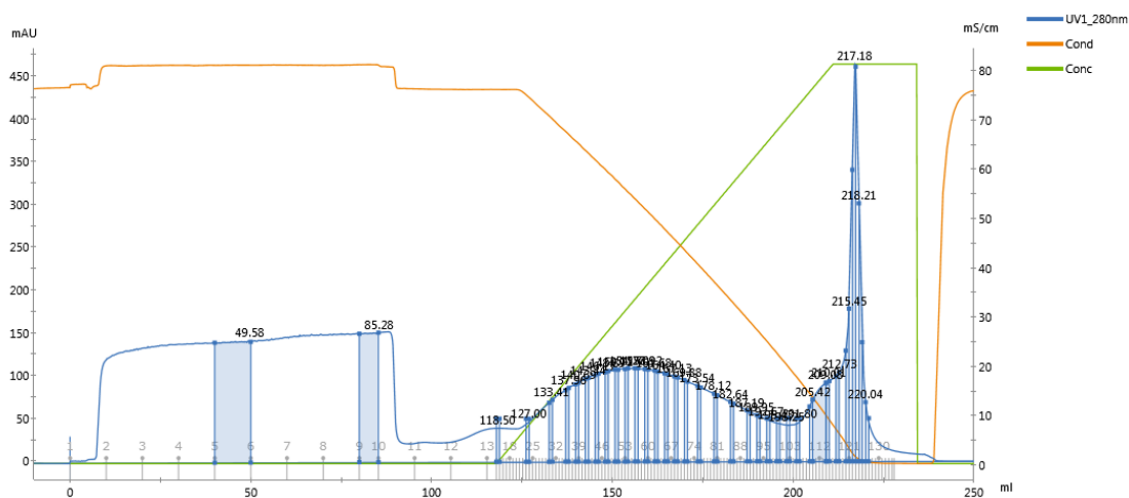
Para determinar la capacidad de unión de la resina Phenyl sepharose HP, es decir la cantidad máxima de QG31 que era capaz de unir la resina Phenyl sepharose HP antes de que saturara y comenzara a perderse la proteína de interés en la fracción de muestra no adsorbida (*flow-through*), se aplicó el producto intermedio AEX obtenido en la cromatografía de intercambio iónico con resina Capto DEAE (54 mL de resina, 10 cm altura, en soporte XK26/20) diluido $\frac{1}{2}$ con 50 mM Tris-HCl, 1 M sulfato amónico, pH 8 (incubado durante 1 h) en la columna HiScreen Phenyl sepharose HP (4.7 mL, 10 cm de altura).

Del mismo modo que en el desarrollo de la etapa cromatográfica AEX, para cada fracción seleccionada se determinó el contenido en proteína total mediante Bradford y mediante SDS-PAGE/densitometría se determinó la pureza de QG31, obteniéndose de este modo la cantidad de QG31 en cada fracción (datos no mostrados). Se concluyó que el volumen de saturación para la columna HiScreen Phenyl Sepharose HP fue de 106.5 mL.

Para trabajar en condiciones no saturantes (80 % del volumen de saturación), se determinó que el volumen a aplicar en la columna HiScreen Phenyl Sepharose HP debía ser de 85.2 mL. Dado que dicha columna tenía 4.7 mL de volumen, el volumen máximo a aplicar por mL de resina era de 18.3 mL de producto intermedio AEX diluido con sulfato amónico hasta 500 mM.

3.4.2.3. Estudio del gradiente lineal en cromatografía HIC

Se estudió el gradiente de elución de QG31 por interacción hidrofóbica en columna HiScreen Phenyl Sepharose HP con tampón Tris-HCl, pH 8 suplementado con sulfato amónico hasta 500 mM. Habiéndose determinado el volumen de saturación para la columna HiScreen Phenyl Sepharose HP en 106.5 mL, se aplicó el 80 % de este volumen (85.2 mL, condiciones no saturantes) a la columna y tras lavar la muestra no unida, la fracción unida se eluyó en 20 CV de gradiente (Figura 3.57). Mediante SDS-PAGE/densitometría se analizaron fracciones representativas del gradiente y se calculó el porcentaje de pureza de QG31 en forma monomérica, dimérica y multimérica (Figura 3.58).



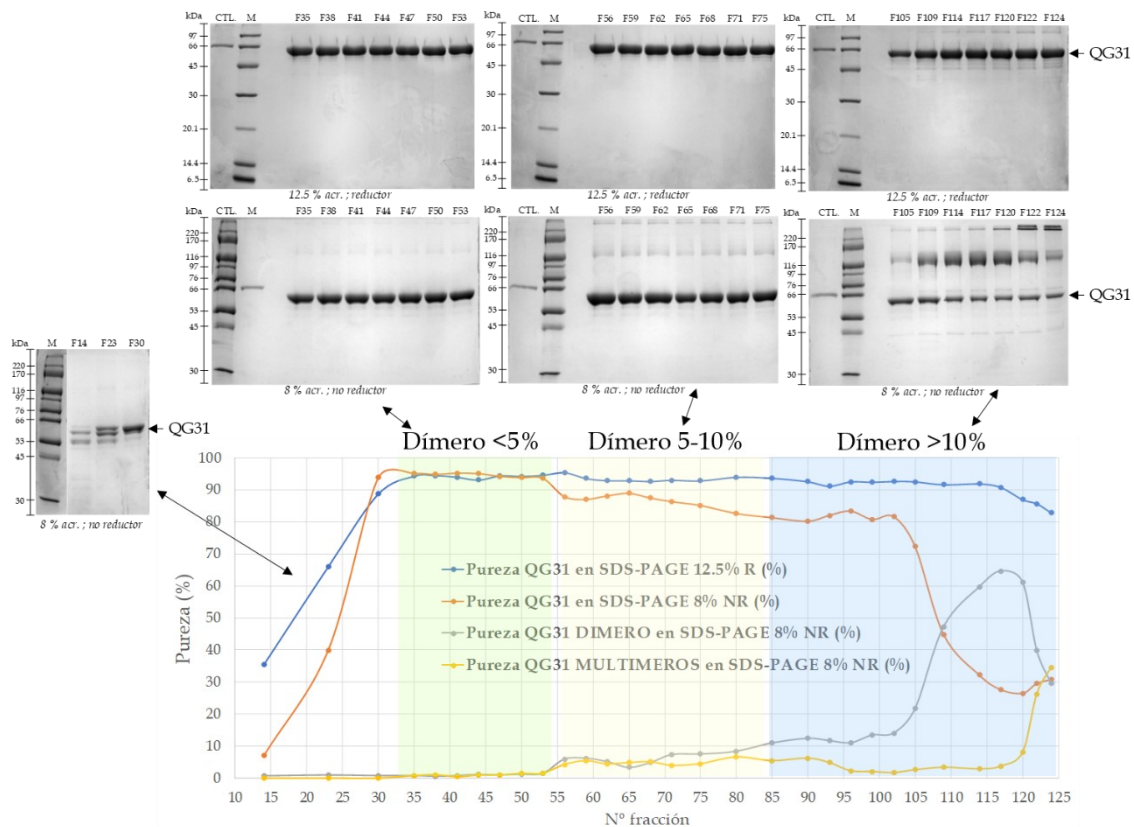


Figura 3.49. Pureza de las formas monoméricas y multiméricas de QG31, expresada en porcentaje (%), de fracciones de la elución en gradiente de la cromatografía en columna HiScreen Phenyl Sepharose HP. CTL: control. M: marcadores.

Se observó que QG31 eluía con una pureza >94 % desde la fracción 35 (conductividad = 67 mS/cm) hasta la fracción 53 (conductividad = 55 mS/cm) (Figura 3.58). En este rango de elución (fracciones 35 a 53), se analizaron las impurezas de producto cuyo porcentaje se resumen en la Tabla 3.63, siendo menor al 6 %. Las impurezas correspondientes a las formas moleculares de mayor tamaño que QG31 era inferior al 3 % mientras que los productos truncados o de degradación constituían menos del 3.8 % de la muestra.

Tabla 3.63. Análisis de las impurezas observadas en la elución en gradiente en columna HiScreen Phenyl Sepharose HP entre las fracciones 35 y 53.

| Fracciones 35 a 53 (conductividad 67 a 55 mS/cm) | | |
|--|---------------------------------|----------------|
| Método de análisis de la pureza | Impurezas de producto | % de impurezas |
| SDS-PAGE 12.5% (Cond. red.) | Bandas de peso molecular < QG31 | 5-6% |
| SDS-PAGE 8% (Cond. no reductoras) | Dímero QG31 | <1.5% |
| | Multímero QG31 | <1.5% |
| | Bandas de peso molecular < QG31 | <3.8% |

En base a los resultados anteriores se decidió proceder al escalado de esta etapa y posteriormente a desarrollar, ya en la escala final, las etapas de lavado y elución.

3.4.2.4. Escalado a soporte XK16/20

Con el objetivo de mantener los flujos lineales empleados hasta el momento con la columna HiScreen de 10 cm de altura (y mantener así el tiempo de residencia), se empaquetó la resina de interacción hidrofóbica (Phenyl Sepharose HP) en soporte XK16/20 hasta una altura de 10 cm (lo que implica un volumen total de 20.1 mL, ya que el diámetro de este soporte es de 1.6 cm).

Mediante el test de empaquetado (ver apartado 2.2.3. "Empaquetado de columnas"), se obtuvo un factor de asimetría (A_s) de 1.23, cumpliéndose el criterio de aceptación de $0.8 < A_s < 1.8$, aceptándose como apto el empaquetado de la columna.

El desarrollo de las siguientes etapas de la cromatografía de interacción hidrofóbica se realizó con esta columna empaquetada.

3.4.2.5. Desarrollo de la etapa de lavado de la cromatografía HIC

a) Número de volúmenes de columna de la etapa de lavado

El análisis del gradiente lineal en la columna HiScreen con resina Phenyl Sepharose HP mostró que QG31 eluía con una pureza superior al 94 % desde una conductividad de 67 mS/cm hasta 55 mS/cm (Tabla 3.63). En las fracciones inmediatamente anteriores a dicha conductividad (fracciones 23 y 30, Figura 3.58), se observan formas truncadas/degradadas de QG31 (peso molecular inferior a QG31) que se reducen en gran medida en fracciones posteriores (fracción 35 y siguientes, Figura 3.58).

Para minimizar dichas formas truncadas/degradadas de QG31 en el producto intermedio de la etapa cromatográfica HIC se decidió ejecutar, análogamente a lo desarrollado para la etapa AEX, una etapa de lavado (para retirar dichas formas) y otra etapa de elución (en la que se esperaba obtener QG31 con una pureza > 94 %).

Se diseñó una etapa de lavado con una conductividad de 69 mS/cm y una etapa de elución de 55 mS/cm, ambas de 6 CV. Los tampones de lavado y elución se obtuvieron adicionando diferentes cantidades de sulfato amónico en el tampón 20 mM Tris-HCl, pH 8 hasta alcanzar las conductividades requeridas en cada caso.

El desarrollo de esta etapa se realizó en la columna empaquetada en el apartado 3.5.2.4: resina Phenyl Sepharose HP empaquetada en carcasa XK16/20.

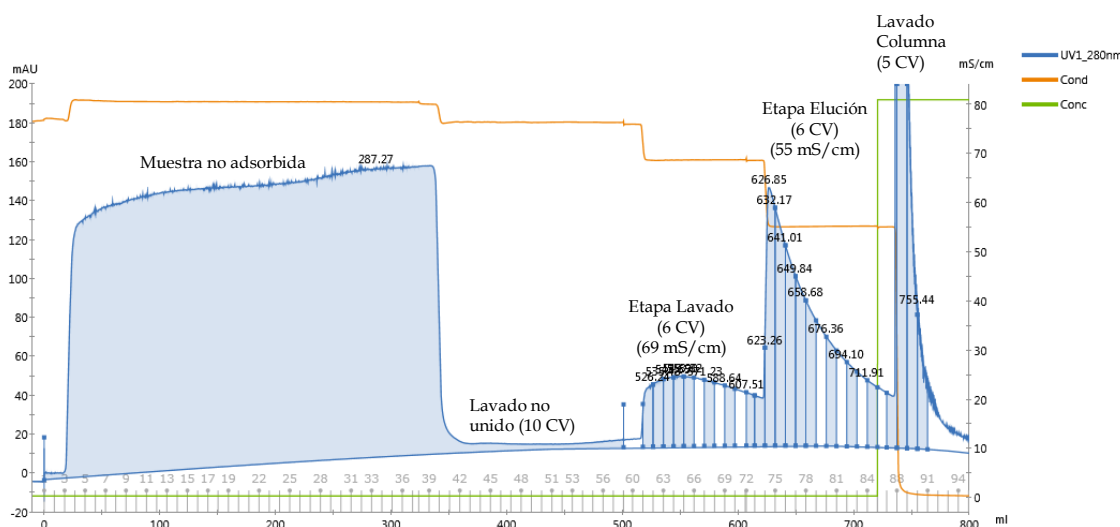


Figura 3.50. Cromatograma en columna XK16/20 Phenyl Sepharose HP. Tampón de unión: 20 mM Tris-HCl, 500 mM sulfato amónico, pH 8. Etapa Lavado: 6 CV de tampón 69 mS/cm. Etapa Elución: 6 CV de tampón 55 mS/cm.

El resultado de la cromatografía HIC en estas condiciones se muestra en la Figura 3.59.

Las fracciones identificadas en color azul en la Figura 3.59 se analizaron por Bradford para cuantificar proteína total y por SDS-PAGE (al 12.5 % y 8 % acrilamida en condiciones reductoras y no reductoras, respectivamente), para determinar la pureza de la proteína QG31 (Figura 3.60).

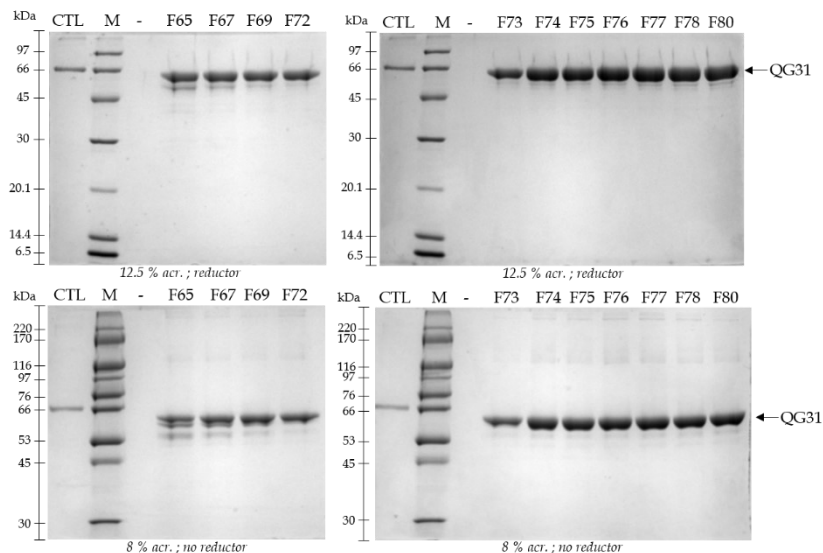


Figura 3.51. SDS-PAGE de la cromatografía en columna XK16/20 Phenyl Sepharose HP. Etapa Lavado: 6 CV de tampón 69 mS/cm. Etapa Elución: 6 CV de tampón 55 mS/cm.

Las fracciones F72 y F73 (Figura 3.60) correspondientes al último volumen de columna de la etapa de lavado (compuesto por 6 CV), tienen una pureza en QG31 de > 93 % en geles acrilamida en 12.5 % reductor por lo que se concluyó que la etapa de lavado se podía acortar y realizar en 5 CV, minimizando así la pérdida de QG31. En los siguientes experimentos, encaminados a fijar la conductividad de la etapa de lavado, se fijó en 5 el número de CV de la etapa de lavado.

b) Conductividad del step de lavado

Se evaluaron diferentes composiciones del tampón de lavado. Se prepararon tampones basados en 20 mM Tris-HCl, pH 8 con distintas cantidades de sulfato amónico para alcanzar las siguientes conductividades:

- a) 64.5 mS/cm
- b) 66.0 mS/cm
- c) 67.5 mS/cm
- d) 69 mS/cm
- e) 70.5 mS/cm

Tras la etapa de lavado de 5 CV, la proteína QG31 se eluyó con 6 CV a una conductividad de 55 mS/cm (etapa de elución). Los cromatogramas de las cromatografías de interacción hidrofóbica correspondientes a las conductividades de 70.5, 67.5, 66.0 y 64.5 mS/cm en el tampón de lavado se muestran en la Figura 3.61. En esta figura no se representa la condición experimental de 69 mS/cm, con 6 CV (apartado anterior).

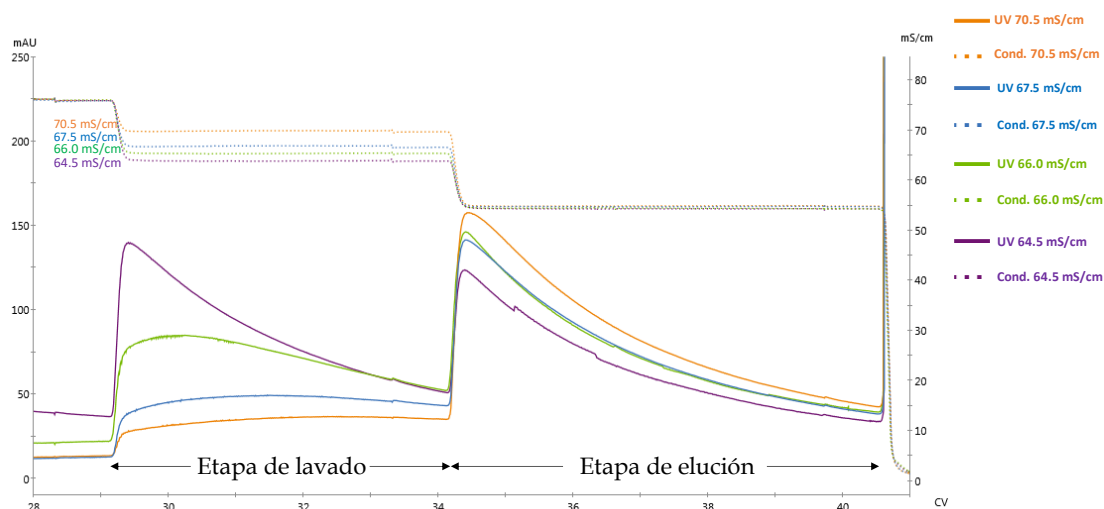


Figura 3.52. Comparación de los perfiles de elución de las cromatografías HIC a distintas conductividades de la etapa de lavado. **Tampón de aplicación:** 20 mM Tris-HCl, pH 8, 500 mM sulfato amónico. **Tampón de lavado:** 20 mM Tris-HCl + 64.5 mS/cm sulfato amónico (morado); 66 mS/cm sulfato amónico (verde); 67.5 mS/cm sulfato amónico (azul); 70.5 mS/cm sulfato amónico (naranja). **Tampón de elución:** 20 mM Tris-HCl, 55 mS/cm sulfato amónico.

El análisis de pureza de QG31 para cada fracción de las etapas de lavado y elución de cada ensayo se muestra en la Figura 3.62.

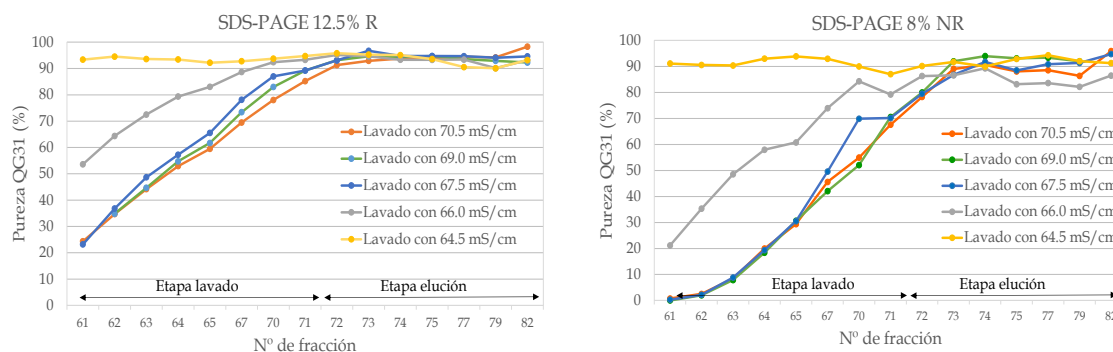


Figura 3.53. Pureza de QG31 de las fracciones de las cromatografías HIC con diferentes conductividades durante la etapa de lavado. Las fracciones 61 a 71 constituyen la etapa de lavado, y las fracciones 72 a 82 la etapa de elución. Análisis en gels al 8 % de acrilamida, en condiciones no reductoras.

Tras mezclar las fracciones individuales de cada etapa de la cromatografía: etapa de lavado (fracciones 61 a 71); y etapa de elución (fracciones 72 a 85), se determinó la pureza y cantidad de QG31 de cada etapa (lavado y elución) a partir de los resultados del análisis SDS-PAGE/densitometría (normalizando mediante Bradford la carga de proteína de cada fracción). Los valores se muestran en la Figura 3.63.

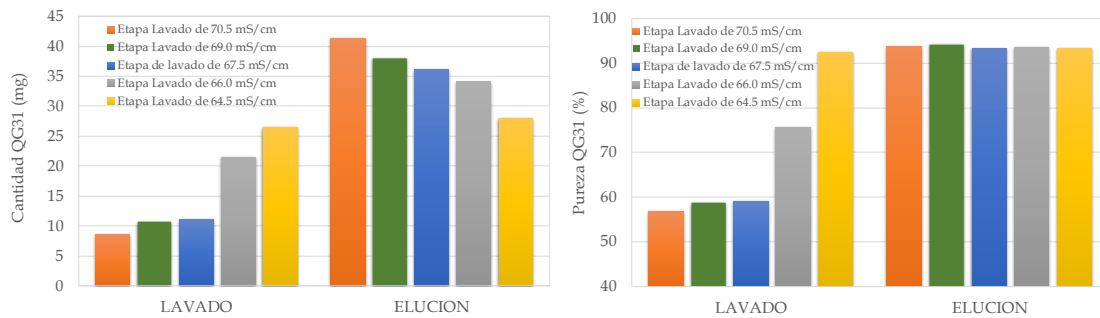


Figura 3.54. Rendimiento (cantidad de QG31) y pureza de QG31 de las cromatografías HIC en el estudio de la conductividad de la etapa de lavado. Se comparan la cantidad de QG31 (panel izquierdo) y la pureza de QG31 en geles al 12.5 %, en condiciones reductoras (panel derecho) en las etapas de lavado y de elución de QG31 según la conductividad de la etapa de lavado.

En la Figura 3.63 se aprecia la disminución de la cantidad de QG31 en la etapa de elución al disminuir la conductividad del tampón de lavado, siendo la caída más drástica al emplear 64.5 mS/cm. Para aumentar el rendimiento de la etapa, convendría elegir la conductividad más alta estudiada. Sin embargo, en el panel derecho de dicha Figura se aprecia que la pureza de las fracciones inmediatamente anteriores a la etapa de elución disminuye al aumentar la conductividad en el lavado. Para asegurar un rango de trabajo en el que el proceso sea lo más robusto posible, reduciendo la variabilidad del proceso y con ello, una posible disminución en la pureza final de QG31, se decidió fijar la conductividad de la etapa de lavado en 66.7 mS/cm (intermedia entre 66 y 67.5 mS/cm), pese a no ser la condición en la que se obtenía el máximo rendimiento.

3.4.2.6. Desarrollo de la etapa de elución de la cromatografía HIC

Una vez establecidas las mejores condiciones de la etapa de lavado de la cromatografía HIC con resina Phenyl sepharose HP:

- 5 volúmenes de columna
 - conductividad del tampón 20 mM Tris-HCl, pH 8 suplementado con sulfato amónico hasta una conductividad de 66.7 mS/cm
- se estudiaron las condiciones de elución.

En las cromatografías realizadas en el estudio de la etapa de lavado se eluyó con un tampón 20 mM Tris-HCl, pH 8 suplementado con sulfato amónico hasta una conductividad de 55 mS/cm. En estas condiciones se detectó la presencia de dímero y multímero, impurezas que se intentó eliminar o al menos reducir en esta etapa.

Para minimizar estas impurezas relacionadas con QG31 se llevaron a cabo otros dos experimentos. Fijando la etapa de lavado con un tampón de conductividad 66.7 mS/cm, se eluyó con un tampón de conductividad 57 mS/cm y 55 mS/cm respectivamente. La pureza de QG31 y contaminantes de producto durante la etapa de elución de ambas cromatografías se analizaron por densitometría en geles SDS-PAGE 8 % acrilamida, en condiciones no reductoras (Figura 3.64).

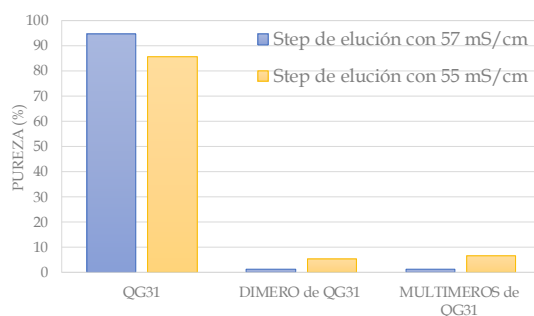


Figura 3.55. Pureza de QG31 y de impurezas de producto de las cromatografías HIC para el estudio de la conductividad de la etapa de elución. Se muestra la pureza analizada por densitometría en SDS-PAGE en geles al 8 % de acrilamida de la etapa de elución a diferentes conductividades: 57 mS/cm (azul) y 55 mS/cm (amarillo) (previa a la elución se realizó en ambos casos una etapa de lavado con 67.5 mS/cm).

Tabla 3.64. Efecto de la conductividad de la etapa de elución sobre el rendimiento y porcentaje de contaminantes en la etapa HIC. La pureza se analizó mediante densitometría en geles SDS-PAGE al 8 % de acrilamida en condiciones no reductoras.

| Conductividad de la etapa de elución | Rendimiento resina (mg QG31 / mL resina) | Rendimiento etapa HIC (mg QG31 eluidos / mg QG31 en aplicación) (%) | Pureza QG31 (%) | Pureza QG31 dimerico (%) | Pureza F. multiméricas de QG31 (%) |
|--------------------------------------|--|---|-----------------|--------------------------|------------------------------------|
| 57 mS/cm | 1.3 | 15.5 | 94.7 | 1.4 | 1.3 |
| 55 mS/cm | 1.8 | 20.9 | 85.8 | 5.3 | 6.6 |

En la Figura 3.64 y en la Tabla 3.64 se puede apreciar que cuando la elución de QG31 con 57 mS/cm aumenta la pureza de QG31 y disminuye las impurezas de producto, siendo la proporción del dímero 1.4 % (frente a 5.3 %) y de las formas multiméricas 1.3 % (frente a 6.6 %).

Pese a que con la conductividad de 57 mS/cm se obtenía un menor rendimiento de la etapa que con 55 mS/cm (15.5 % respecto a 20.8 %) y un menor rendimiento de la resina (1.3 mg QG31/mL de resina respecto a 1.8 mg QG31/mL de resina) se decidió fijar la conductividad de la etapa de elución en 57 mS/cm al obtenerse en esta condición una pureza superior al 90 % para QG31 y menor presencia de dímeros y multimeros (Tabla 3.64).

3.4.2.7. Condiciones de cromatografía de interacción hidrofóbica

Se concluyó, por tanto, que la cromatografía de QG31 en la resina de interacción hidrofóbica (Phenyl Sepharose HP) en soporte XK16/20 hasta una altura de 10 cm se realizaría con los siguientes parámetros:

- Aplicación de 9.15 mL de producto intermedio AEX (18.3 mL una vez diluido $\frac{1}{2}$ con 20 mM Tris-HCl, pH 8, 1 M sulfato amónico) por mL de resina
- Lavado de la fracción no unida con 10 CV de tampón 20 mM Tris-HCl, pH 8, 500 mM sulfato amónico
- Etapa de lavado con tampón a 66.7 mS/cm (20 mM Tris-HCl, pH 8, 425 mM sulfato amónico)
- Etapa de elución con tampón a 57 mS/cm (20 mM Tris-HCl, pH 8, 330 mM sulfato amónico) que constituyó el "Producto Intermedio HIC"

Empleando las condiciones anteriormente descritas, se obtuvo un producto intermedio HIC con una pureza de 94 % (en geles SDS-PAGE, 12.5 % de acrilamida, condiciones reductoras). El rendimiento de la etapa HIC (mg QG31 obtenidos respecto a aplicados) fue de 15.5 % y la resina consiguió capturar 1.35 mg QG31/mL de resina.

3.4.3. Tercera etapa cromatográfica: DSC

Como último paso en el proceso de purificación cromatográfica de QG31 se decidió utilizar una etapa de tamizado molecular con el objetivo de eliminar reactivos de proceso como el sulfato amónico e intercambiar el tampón del producto QG31 por la composición final 2 mM fosfato sódico, pH 7.5, 0.9 % NaCl. Para ello, el producto intermedio HIC obtenido en las condiciones descritas en el apartado 3.5.2.7., se inyectó en una columna HiPrep 26/10 Desalting (GE Healthcare) equilibrada en dicho tampón (Figura 3.65).

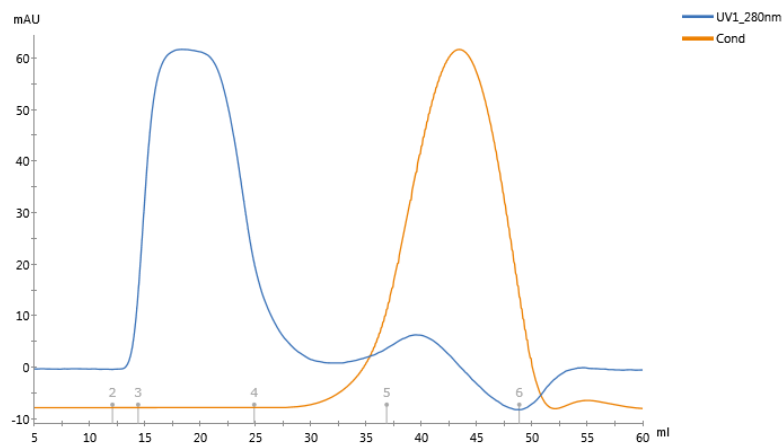


Figura 3.56. Perfil de elución de cromatografía de desalado. Fase móvil: 2 mM fosfato sódico, pH 7.5, 0.9 % NaCl.

Tras recoger las fracciones con una absorbancia mayor de 5 mAU, en las que eluía QG31, el producto fue analizado y alicuotado conservándose a <-80 °C.

3.5. ANÁLISIS DEL PRODUCTO FINAL QG31

El esquema global del proceso de purificación de QG31 se muestra en la Figura 3.66.

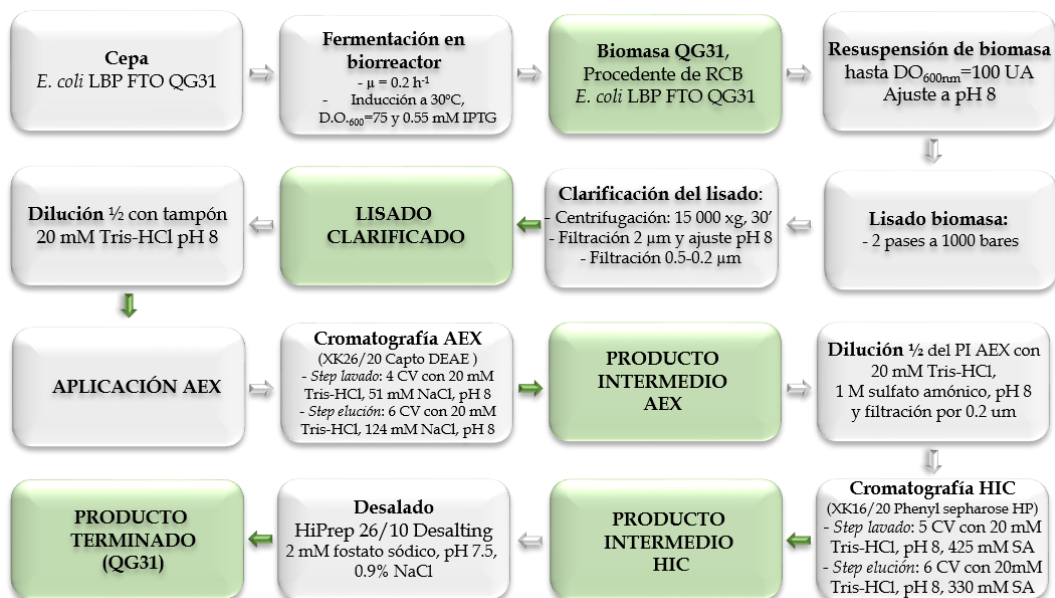


Figura 3.57. Esquema de la purificación hasta producto terminado de QG31. En verde se muestran los diferentes productos intermedios, es decir, el producto final de cada etapa y en gris los procesos.

Una vez obtenido el producto final, se analizaron los atributos de calidad por las diferentes técnicas analíticas.

SDS-PAGE y Western blot

Tras analizar el producto final obtenido por SDS-PAGE y Western blot (Figura 3.67) se observó que QG31 migraba con un peso molecular aparente de 62 kDa en SDS-PAGE con una pureza superior al 96 % (96.5 % en geles al 12.5 % acrilamida en condiciones reductoras y 98.9 % en geles al 8 % acrilamida en condiciones reductoras). En condiciones no reductoras se aprecia una banda de peso molecular aparente de 129 kDa, de únicamente 2.5 % de pureza. En Western blot además de esta banda se aprecia una tenue banda de peso molecular aparente de 308 kDa.

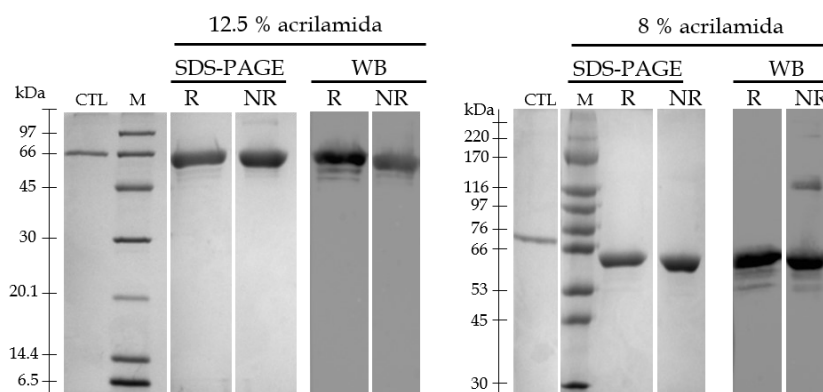


Figura 3.58. SDS-PAGE y Western blot del producto terminado QG31. CTL: control de destinción. M: marcadores de peso molecular. R: condiciones reductoras. NR: condiciones no reductoras. WB: Western blot.

Cromatografía analítica de tamizado molecular (SEC)

El análisis por cromatografía analítica de tamizado molecular (Figura 3.68) dio como resultado un único pico a un volumen de elución de 7.88 mL, no detectándose otras formas multiméricas.

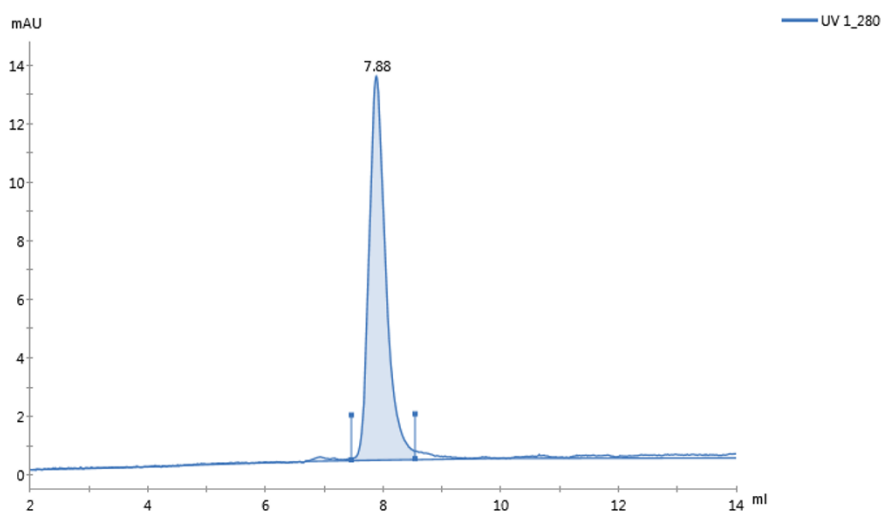


Figura 3.59. Perfil de elución en cromatografía analítica de tamizado molecular (SEC) del producto terminado QG31. En el eje de ordenadas se representa la absorbancia (mAU). En el eje de abscisas se representa el volumen de elución (mL). La columna empleada fue BioSEC-5 5 μm , 300 \AA , 7.8 x 300 mm, Agilent y la fase móvil 2 mM fosfato sódico, pH 7.5, 0.9 % NaCl.

Cromatografía analítica de fase reversa (RP)

El análisis por cromatografía analítica de fase reversa (Figura 3.69) dio como resultado un único pico a un volumen de elución de 47.85 mL, sin apreciarse oxidación de la muestra.

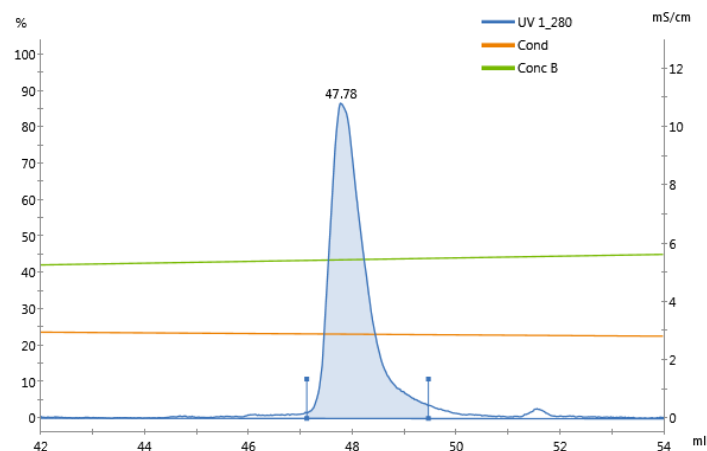


Figura 3.60. Perfil de elución en cromatografía de fase reversa. En el eje de ordenadas se representa la absorbancia (mAU). En el eje de abscisas se representa el volumen de elución (mL). Columna: ZORBAX 300SB-C18 (Agilent). Tampón A: 0.1 % de trifluoroacético en agua ultrapurificada. Tampón B: 0.1 % de trifluoroacético en acetonitrilo.

Actividad alérgica

En el ensayo de actividad alérgica por ELISA inhibición, se hizo competir con los IgE de sueros de pacientes sensibilizados a gramíneas por un lado una mezcla de las proteínas Phl p 1 + Phl p 5 y por otro lado el producto terminado QG31 (Figura 3.70).

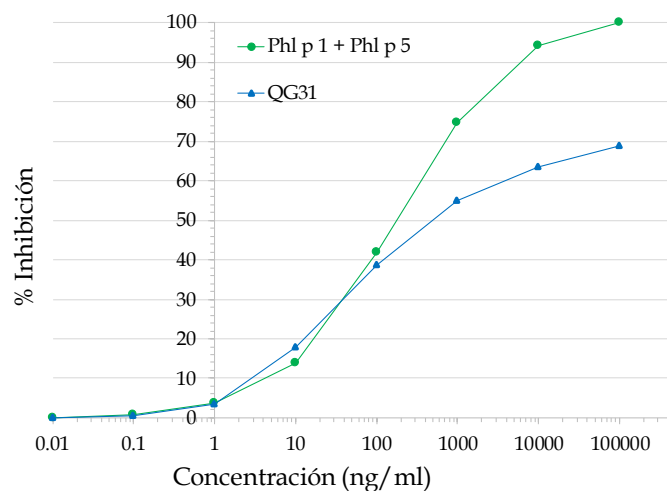


Figura 3.61. Porcentaje de inhibición de la unión de IgE de pacientes de gramíneas a extracto de *Phleum pratense* por una mezcla de las proteínas naturales "Phl p 1 + Phl p 5" (línea verde y círculos) y por QG31 (línea azul y triángulos). El eje de ordenadas muestra el porcentaje de inhibición y el de abscisas la concentración de QG31 o de la mezcla "Phl p 1 + Phl p 5".

Como se observa en la Figura 3.70, la mezcla "Phl p 1 + Phl p 5" alcanza el 100 % de inhibición a la máxima concentración estudiada (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), mientras que, a esa misma concentración, QG31 sólo alcanza en 69 % de inhibición. Esa misma inhibición es obtenida por la mezcla "Phl p 1 + Phl p 5" a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo que indicaría que QG31 tiene, por tanto, una capacidad de unir IgE 200 veces inferior a la mezcla natural, confirmando su hipoalergenicidad.

Contenido en endotoxinas

Durante la primera fase de desarrollo de la producción de QG31 se obtuvo en el producto final una concentración de QG31 de 480 µg/mL y una concentración de endotoxinas de 420 EU/µg de proteína QG31. En base al límite de endotoxinas admitido por la Farmacopea Europea (700 EU/dosis), la dosis máxima sería de 2 µg, incompatible con la dosis estimada de 100 µg de QG31.

Era por tanto esencial reducir la concentración de endotoxinas. Para conseguir este objetivo, toda la etapa de producción de QG31 se realizó utilizando prácticas que minimizaran la introducción de sustancias pirogénicas (endotoxinas) del exterior:

- Se extremaron las condiciones de limpieza, tanto de los equipos como de las instalaciones dentro de la normativa de calidad de la empresa relativa a zonas de grado C, con registros de limpieza, vestuario, diferencias de presiones en las salas dedicadas a USP y DSP, y conteo de partículas en suspensión.
- Se empleó material de vidrio despirogenado mediante tratamiento en horno a 160 °C durante 6 h.
- Se empleó material de plástico de un solo uso.
- Las soluciones y tampones se esterilizaron mediante filtros de 0.22 µm de tamaño de poro.

Tras aplicar estas mejoras en el desarrollo de la purificación de QG31, se consiguió reducir 6 órdenes de magnitud la concentración de endotoxinas (EU/mL) desde la aplicación en la columna AEX hasta la obtención del producto terminado (Figura 3.71).

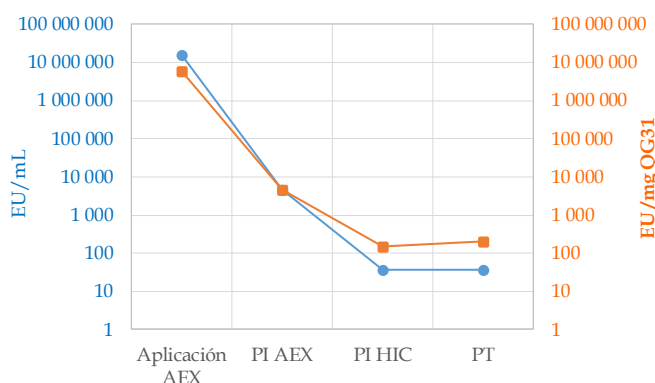


Figura 3.62. Concentración de endotoxinas tras cada etapa de purificación de QG31. Eje izquierdo (curva azul): concentración de endotoxinas (EU/mL). Eje derecho (curva naranja): concentración de endotoxinas por cantidad de producto terminado (EU/mg QG31). PI AEX: Producto Intermedio de la cromatografía de intercambio aniónico AEX. PI HIC: Producto Intermedio de la cromatografía de interacción hidrofóbica. PT: Producto Terminado QG31.

El producto terminado obtenido contenía una concentración de QG31 de 0.18 mg/mL y una concentración de endotoxinas de 203 EU/mg de QG31, permitiendo en este caso aplicar hasta 3.4 mg de QG31 por dosis, valor que excede el valor estimado de dosis de 100 µg. Según estos resultados, la dosis estimada de QG31 en la vacuna (100 µg), tendría un contenido de endotoxinas de 20.3 EU, valor 34 veces inferior al máximo permitido en Farmacopea (700 EU/dosis). De este modo, el valor de endotoxinas no sería limitante y permitiría aumentar la dosis del principio activo (QG31) si así lo requirieran los ensayos clínicos de dosis/respuesta durante la Fase II del desarrollo de ensayos clínicos.

Contenido en HCPs (Host Cell Proteins)

Se evaluó el contenido de otras impurezas de proceso, como las proteínas procedentes del microorganismo hospedador, *E. coli* en este caso, las llamadas HCPs (Host Cell Proteins). Se midieron las HCPs en todos los productos intermedios del proceso, así como en el producto final (Figura 3.72).

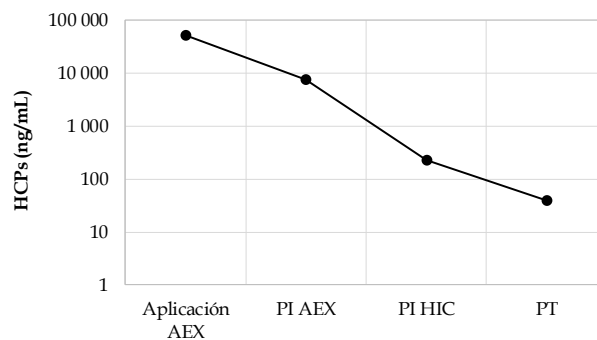


Figura 3.63. Concentración de HCPs tras cada etapa de purificación de QG31. PI AEX: Producto Intermedio de la cromatografía de intercambio aniónico AEX. PI HIC: Producto Intermedio de la cromatografía de interacción hidrofóbica. PT: Producto Terminado QG31.

Se observó una disminución de 3 órdenes de magnitud en la concentración de HCPs, obteniéndose una concentración final de 39 ng/mL en el producto final. Si bien, no existen límites fijados por los organismos reguladores para este contaminante de proceso, la especificación más aceptada en la mayoría de los productos farmacéuticos actuales, sobre todo, productos biológicos del tipo de anticuerpos monoclonales, es que la cantidad total de HCPs no debe ser superior a 100 ppm. En nuestra preparación actual de producto terminado, el contenido de estos contaminantes era en torno a 217 ppm, por lo tanto, sería necesario incluir alguna etapa para reducir este valor.

3.7. ESTUDIOS DE FORMULACIÓN

La composición más habitual en las vacunas de inmunoterapia específica para el tratamiento de alergias incluye fenol, como agente fungicida y bactericida, y gel de hidróxido de aluminio, como adyuvante, tanto por su capacidad para adherir el antígeno y liberarlo gradualmente, como por sus propiedades inmunogénicas.

Se estudió la capacidad de unión de QG31 al hidróxido de aluminio en presencia de fenol y de diferentes tampones utilizados en la práctica clínica y que además eran compatibles con QG31: fosfato sódico (empleado en la tercera etapa cromatográfica (DSC) y carbonato sódico, como posible candidato para sustituir el fosfato sódico en la formulación final.

Para ello, se incubó QG31 en 10 mM de tampón fosfato o carbonato sódico en presencia de 0.5 % fenol y 0.2 % alhydrogel durante diferentes tiempos de incubación (1.5 h, 18 h, 3 meses). Como muestra control (referencia de 100 % QG31 no unido a hidróxido de aluminio) se utilizaron muestras de QG31 en solución salina, pero sin hidróxido de aluminio.

La concentración de QG31 se analizó, mediante ELISA, en el sobrenadante tras centrifugar cada muestra durante 5 min a 14 500 rpm. De este modo, la muestra unida a hidróxido de

aluminio quedaba en el pellet, y en el sobrenadante quedaba la fracción no unida. En el control, al no haber hidróxido de aluminio, toda la muestra quedaba en el sobrenadante (Figura 3.73).

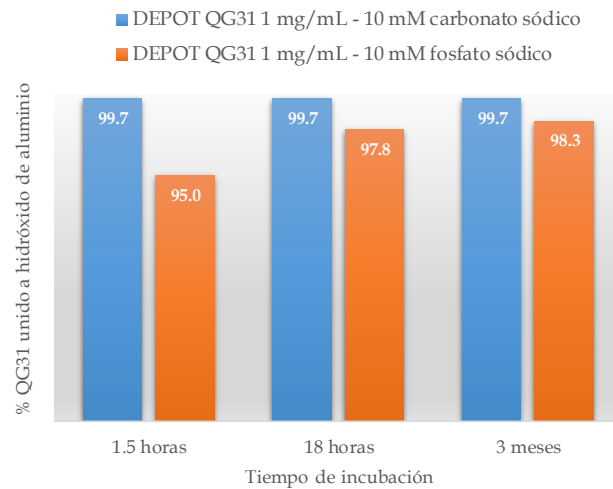


Figura 3.64. Unión de QG31 a hidróxido de aluminio (Alhydrogel) tras incubación a 2-8 °C durante 1.5 h, 18 h y 3 meses en presencia de fenol y carbonato sódico (azul) o fenol y fosfato sódico (naranja).

Se pudo concluir que el porcentaje de unión de QG31 al hidróxido de aluminio era $\geq 95\%$, y que se mantenía estable durante el tiempo estudiado (3 meses). Existía una pequeña diferencia entre el comportamiento de QG31 en ambos tampones, ya que se unía mejor al gel de hidróxido de aluminio en presencia de carbonato ($>99.5\%$) y esta unión se mantenía hasta 3 meses, mientras que en presencia de fosfato la unión era mayor con el tiempo pasando de 95% a las 1.5 horas, hasta 98% a los 3 meses. En ambos casos el grado de unión ($\geq 95\%$) cumple holgadamente la especificación para productos depot que establece que la unión debe ser superior a 80%.

4

RESUMEN

4. RESUMEN

La alergia al polen (polinosis) es una de las alergias más comunes, afectando a un quinto de la población europea, y la causa más importante de alergia respiratoria estacional, causando rinoconjuntivitis y asma.

Gracias a la inmunoterapia, los pacientes ven reducidos sus síntomas y la continua necesidad de tratamientos farmacológicos. Sin embargo, las vacunas actuales basadas en extractos naturales de la fuente alérgica, no están exentas de riesgos (contaminaciones cruzadas, shock anafiláctico...) y poseen limitaciones (variabilidad en la composición de los alérgenos que afecta a la estandarización de los productos, administración de bajas dosis que alargan el tratamiento...).

Ante la necesidad de desarrollar mejores productos, este trabajo ha buscado el desarrollo de un método de fabricación de una vacuna hipoalérgica específica, segura, reproducible, eficaz e inmunogénica para el tratamiento de la alergia a gramíneas. La molécula de interés es una proteína recombinante purificada, y por tanto una molécula definida y con alta pureza, con el objetivo de controlar la composición alérgica exacta de la vacuna a una concentración predeterminada. Esta vacuna, al contrario que las vacunas basadas en extractos alérgicos, estará exenta de otras proteínas y biomoléculas que podrían provocar efectos secundarios adversos o nuevas sensibilizaciones.

Esta molécula, QG31, se diseñó como una quimera de los principales alérgenos (mayor prevalencia y potencia alérgica) de gramíneas (Phl p 1 y Phl p 5) con el objetivo de mantener la mayor parte de los epítomos específicos de alérgeno de los linfocitos T (induciendo la respuesta IgG y manteniendo así la inmunogenicidad), pero inducir una menor producción de anticuerpos IgE (reduciendo así la alergenidad) que la versión sin modificar. Con esta reducción en la alergenidad se pretende poder administrar dosis más altas durante el tratamiento de inmunoterapia, y lograr, con un menor número de inyecciones, una mayor producción de anticuerpos IgG específicos de alérgeno.

Tras una primera prueba de concepto, en la que se verificó la viabilidad de la molécula como principio activo de una vacuna hipoalérgica, se llevó a cabo la Fase I en la que se procedió a fabricar varios lotes de la molécula QG31. Esta etapa permitió, por una parte, comprobar el excelente grado de reproducibilidad de los métodos y procesos utilizados, base fundamental para el abordaje de un desarrollo farmacéutico. Adicionalmente, permitió conocer los puntos críticos del proceso y desarrollar las técnicas analíticas que serían necesarias para realizar los controles de proceso (IPC, *In Process Control*, chequeos realizados durante el proceso para monitorizar el progreso del mismo) y para definir el perfil de calidad del producto (QTPP, *Quality Target Product Profile*) y los atributos críticos de calidad (CQAs, *Critical Quality Attributes*). Además, permitió identificar las etapas del proceso donde se debía mejorar y los CQAs que debieran optimizarse.

Con el material de QG31 obtenido en la primera fase desarrollo (a pequeña escala), se desarrollaron los métodos analíticos que darían soporte al desarrollo del proceso de obtención de la molécula QG31 pura, que sería la sustancia activa constitutiva de la vacuna comercial. Estos métodos fueron también cualificados para determinar las condiciones óptimas en que se debía trabajar con cada técnica, los rangos de cada técnica y las matrices (o tampones) que afectaban a los resultados experimentales proporcionados por cada una de ellas.

En una segunda fase, se trabajó con el objetivo de obtener un proceso que fuera fácilmente escalable con vistas a un proceso industrial. Para ello se obtuvo una materia prima, en este caso una cepa de *E. coli* que expresara la proteína de interés y fuera propiedad de la empresa, es decir un sistema de expresión (cepa hospedadora y vector de expresión) FTO (*Freedom to Operate*), es

decir, no sujeto a ningún pago por su uso industrial como lo son casi todos los sistemas de expresión comerciales. Se establecieron las condiciones para la sobreexpresión de QG31 en este nuevo sistema de expresión en biorreactor y el lisado de la biomasa obtenida. Gracias al desarrollo de esta etapa, basado en el diseño de experimentos, se pudo definir un rango de trabajo en el que la calidad del producto no se viera afectada. Este tipo de estudios (diseño de experimentos) permite analizar el efecto conjunto de múltiples variables sobre un proceso con el mínimo número de ensayos.

Con la biomasa obtenida en biorreactor, se desarrolló la etapa de purificación (mediante cromatografía) de QG31. Para el escalado se emplearon columnas con resina comercial empaquetada en carcasas. Con este tipo de columnas, que permiten elegir las dimensiones de las mismas, se pudo aumentar el volumen total de resina de la columna, manteniendo los flujos lineales (y con ello el tiempo de residencia) empleados con columnas comerciales más pequeñas empleadas durante el desarrollo.

El desarrollo de la primera fase identificó las limitaciones del proceso y así determinó los puntos que, en una segunda fase, fueron mejorados para obtener un producto de mayor calidad, mediante un proceso robusto en el que la variabilidad de la calidad del producto fuera mínima al producir sucesivos lotes industriales.

Es por ello que, en la segunda fase, el trabajo realizado consistió en desarrollar cada etapa del proceso centrándose en disminuir la concentración de endotoxinas, de HCPs, de impurezas de producto procurando al mismo tiempo, cuando era posible sin sacrificar la pureza del producto, obtener el máximo rendimiento posible. La estrategia que se siguió para estudiar el efecto de los diversos parámetros del proceso fue el diseño de experimentos. De este modo, se conocieron los parámetros que tenían un mayor efecto sobre la calidad del producto y se estableció el rango de trabajo para cada etapa del proceso. El desarrollo previo de las técnicas analíticas fue fundamental en esta etapa para garantizar un análisis ortogonal.

Tras fijar las condiciones y realizar el proceso completo, se analizó con las técnicas desarrolladas el producto QG31 obtenido. Se pudo concluir que el proceso de sobreexpresión y purificación de la molécula QG31 era viable y la molécula obtenida cumplía los requisitos de hiperalergenicidad (respecto a las proteínas nativas) así como contenido en endotoxinas y HCPs entre otros requeridos para constituir un producto sanitario.

Durante todo el proyecto se siguió la estrategia de Calidad desde el Diseño (QbD) según la cual la estrategia de fabricación basa la calidad del producto, no tanto en la comprobación de sus especificaciones, sino en un conocimiento profundo del producto y del proceso de fabricación, así como en un control exhaustivo del proceso. Es por ello que en cada etapa se hizo un riguroso estudio de cómo afectaban las variables del proceso en la calidad del producto, para obtener finalmente un proceso de fabricación robusto que permita mantener una calidad constante a lo largo de la vida del producto.

5

CONCLUSIONES



5. CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado y caracterizado un sistema de expresión de uso libre, alta capacidad de expresión, rápido crecimiento, y excelente reproducibilidad para la producción de la proteína QG31, proteína recombinante quimérica e hipoalergénica que podría constituir la base de una novedosa vacuna contra la alergia a gramíneas.
2. Se ha diseñado un proceso de purificación de QG31, y su escalado para una producción a escala industrial bajo estándares GMP.
3. Se ha llevado a cabo la caracterización funcional y bioquímica de la proteína híbrida QG31.
4. Se ha logrado la cualificación de diversas técnicas analíticas que han posibilitado la toma de decisiones técnicas a lo largo del proceso de desarrollo del producto, así como una caracterización ortogonal de los productos intermedios y el producto terminado.

6

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Kindt TA, Goldsby RA, Osborne BA. *Inmunología de Kuby*. Vol 1. McGraw-Hi.; 2004.
2. Murphy K. *Inmunobiología de Janeway*.; 2012.
3. Larché M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(10):761-771.
4. Wai C. From Molecule Studies of Allergens to Development of Immunotherapy of Allergies. *J Allergy Ther*. 2012;03(03).
5. Schoenwetter WF. Allergic rhinitis: epidemiology and natural history. *Allergy Asthma Proc*. 2000;21(1):1-6.
6. Hankin CS, Cox L. Allergy immunotherapy: What is the evidence for cost saving? *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2014;14(4):363-370.
7. Ozdoganoglu T, Songu M. The burden of allergic rhinitis and asthma. *Ther Adv Respir Dis*. 2012;6(1):11-23.
8. Petersen KD, Kronborg C, Larsen JN, Dahl R, Gyrd-Hansen D. Patient related outcomes in a real life prospective follow up study: Allergen immunotherapy increase quality of life and reduce sick days. *World Allergy Organ J*. 2013;6(1):1-9.
9. Leynaert B, Neukirch C, Liard R, Bousquet J, Neukirch F. Quality of life in allergic rhinitis and asthma: A population-based study of young adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162(4 I):1391-1396.
10. Meltzer EO. Quality of life in adults and children with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(1 SUPPL.):45-53.
11. Walker S, Khan-Wasti S, Fletcher M, Cullinan P, Harris J, Sheikh A. Seasonal allergic rhinitis is associated with a detrimental effect on examination performance in United Kingdom teenagers: Case-control study. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(2):381-387.
12. Scadding G, Walker S. Poor asthma control? - then look up the nose. The importance of co-morbid rhinitis in patients with asthma. *Prim Care Respir J*. 2012;21(2):222-228.
13. Guerra S, Sherrill DL, Martinez FD, Barbee RA. Rhinitis as an independent risk factor for adult-onset asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2002;109(3):419-425.
14. Feng CH, Miller MD, Simon RA. The united allergic airway: Connections between allergic rhinitis, asthma, and chronic sinusitis. *Am J Rhinol Allergy*. 2012;26(3):187-190.
15. Nihlén U, Greiff L, Montnémy P, Löfdahl CG, Johannisson A, Persson C, Andersson M. Incidence and remission of self-reported allergic rhinitis symptoms in adults. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2006;61(11):1299-1304.
16. Cardell LO, Olsson P, Andersson M, Welin KO, Svensson J, Tennvall GR, Hellgren J. TOTAL: High cost of allergic rhinitis - A national Swedish population-based questionnaire study. *npj Prim Care Respir Med*. 2016;26(August 2015).
17. EFA (European Federation of Allergy and Airways Diseases Patients' Associations). <https://www.efanet.org/written-declaration-crd>
18. Levin M, Rydnert F, Källström E, Tan LW, Wormald PJ, Lindstedt M, Greiff L, Ohlin M. Phl p 1-Specific Human Monoclonal IgE and Design of a Hypoallergenic Group 1 Grass Pollen Allergen Fragment. *J Immunol*. 2013;191(2):551-560.

19. Suphioglu C, Mansur AH. What are the important allergens in grass pollen that are linked to human allergic disease? *Clin Exp Allergy*. 2000;30(10):1335-1341.
20. D'Amato G, Spieksma FTM, Liccardi G, Jäger S, Russo M, Kontou-Fili K, Nikkels H, Wüthrich B, Bonini S. Pollen-related allergy in Europe. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 1998;53(6):567-578.
21. D'Amato G, Cecchi L, Bonini S, Nunes C, Annesi-Maesano I, Behrendt H, Liccardi G, Popov T, Van Cauwenberge P. Allergenic pollen and pollen allergy in Europe. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2007;62(9):976-990.
22. D'Amato G, Liccardi G, Frenguelli G. Thunderstorm-asthma and pollen allergy. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2007;62(1):11-16.
23. D'Amato G. Urban air pollution and plant-derived respiratory allergy. *Clin Exp Allergy*. 2000;30(5):628-636.
24. Andersson K, Lidholm J. Characteristics and immunobiology of grass pollen allergens. *Int Arch Allergy Immunol*. 2003;130(2):87-107.
25. Moingeon P, Hrabina M, Bergmann KC, Jaeger S, Frati F, Bordas V, Peltre G. Specific immunotherapy for common grass pollen allergies: Pertinence of a five grass pollen vaccine. *Int Arch Allergy Immunol*. 2008;146(4):338-342.
26. REA (Red Española de Aerobiología).
27. Marsh D, Goodfriend L, King T, Lowenstein H, Platts-Mills T. Allergen nomenclature. *Bull World Heal Organ*. 1986;64:767-774.
28. King T, Hoffman D, Lowenstein H, Marsh D, Platts-Mills T, Thomas W. Allergen nomenclature. *Bull World Heal Organ*. 1994;72:797-806.
29. King TP, Hoffman D, Lowenstein H, Tae MDGP, Auereen TW. Special report Allergen nomenclature. 1995;50:765-774.
30. Pomés A, Davies JM, Gadermaier G, Hilger C, Holzhauser T, Lidholm J, Lopata AL, Mueller GA, Nandy A, Radauer C, Chan SK, Jappe U, Kleine-Tebbe J, Thomas WR, Chapman MD, van Hage M, van Ree R, Vieths S, Raulf M, Goodman RE. WHO/IUIS Allergen Nomenclature: Providing a common language. *Mol Immunol*. 2018;100(March):3-13.
31. Breiteneder H, Chapman MD. Allergen Nomenclature. *Allergens Allerg Immunother*. Published online 2014:37-49.
32. Laffer S, Vrtala S, Duchêne M, van Ree R, Kraft D, Scheiner O, Valenta R. IgE-binding capacity of recombinant timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 1994;94(1):88-94.
33. Niederberger V, Laffer S, Fröschl R, Kraft D, Rumpold H, Kapiotis S, Valenta R, Spitzauer S. IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, and Bet v 2) account for a high percentage of grass pollen-specific IgE. *J Allergy Clin Immunol*. 1998;101(2 I):258-264.
34. Laffer S, Spitzauer S, Susani M, Pairleitner H, Schweiger C, Grönlund H, Menz G, Pauli G, Ishii T, Nolte H, Ebner C, Schon AH, Kraft D, Eichler HG, Valenta R. Comparison of recombinant timothy grass pollen allergens with natural extract for diagnosis of grass pollen allergy in different populations. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98(3):652-658.
35. Laffer S, Duchene M, Reimitzer I, Susani M, Mannhalter C, Kraft D, Valenta R. Common IgE-epitopes of recombinant Phl p I, the major timothy grass pollen allergen and natural group I grass pollen isoallergens. *Mol Immunol*. 1996;33(4-5):417-426.

36. Ball T, Edstrom W, Mauch L, Schmitt J, Leistler B, Fiebig H, Sperr WR, Hauswirth AW, Valent P, Kraft D, Almo SC, Valenta R. Gain of structure and IgE epitopes by eukaryotic expression of the major Timothy grass pollen allergen, Phl p 1. *FEBS J.* 2005;272(1):217-227.
37. Petersen A, Schramm G, Bufe A, Schlaak M, Becker WM. Structural investigations of the major allergen Phl p I on the complementary DNA and protein level. *J Allergy Clin Immunol.* 1995;95(5):987-994.
38. Schenk S, Breiteneder H, Susani M, Najafian N, Laffer S, Duchène M, Valenta R, Fischer G, Scheiner O, Kraft D, Ebner C. T-cell epitopes of Phl p 1, major pollen allergen of timothy grass (*Phleum pratense*): Evidence for crossreacting and non-crossreacting T-cell epitopes within grass group I allergens. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL.* 1995;96 (6 Pt 1):986-996.
39. Rossi R, Monasterolo G, Operti D, Operti R, Berlen R. Evaluation of IgE antibodies to recombinant pollen allergens (Phl p 1, Phl p 2, and Phl p 5) in a random sample of patients with specific IgE to *Phleum pratense*. *Allergy.* 2000;55(2):181-184.
40. Vrtala S, Susani M, Sperr WR, Valent P, Laffer S, Dolecek C, Kraft D, Valenta R. Immunologic characterization of purified recombinant timothy grass pollen (*Phleum pratense*) allergens (Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5). *J Allergy Clin Immunol.* 1996;97(3):781-787.
41. Suck R, Petersen A, Weber B, Becker WM, Fiebig H, Cromwell O. Analytical and preparative native polyacrylamide gel electrophoresis: Investigation of the recombinant and natural major grass pollen allergen Phl p 2. *Electrophoresis.* 2004;25(1):14-19.
42. Marino SD, Morelli MC, Fraternali F, Tamborini E, Musco G, Vrtala S, Dolecek C, Arosio P, Valenta R, Pastore A. An immunoglobulin-like fold in a major plant allergen: the solution structure of Phl p 2 from timothy grass pollen. *Structure.* 1999;7(8):943-952.
43. Dolecek C, Vrtala S, Laffer S, Steinberger P, Kraft D, Scheiner O, Valenta R. Molecular characterization of Phl p II, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *FEBS Lett.* 1993;335(3):299-304.
44. Fahlbusch B, Müller WD, Rudeschko O, Jäger L, Cromwell O, Fiebig H. Detection and quantification of group 4 allergens in grass pollen extracts using monoclonal antibodies. *Clin Exp Allergy.* 1998;28(7):799-807.
45. Fischer S, Grote M, Fahlbusch B, Müller WD, Kraft D, Valenta R. Characterization of Phl p 4, a major timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen. *J Allergy Clin Immunol.* 1996;98(1):189-198.
46. Rossi RE, Monasterolo G, Monasterolo S. Measurement of IgE antibodies against purified grass-pollen. *Allergy.* 2001;(56):1180-1185.
47. Maglio O, Saldanha JW, Vrtala S, Spitzauer S, Valenta R, Pastore A. A major IgE epitope-containing grass pollen allergen domain from Phl p 5 folds as a four-helix bundle. *Protein Eng.* 2002;15(8):635-642.
48. Flicker S, Vrtala S, Steinberger P, Vangelista L, Bufe A, Petersen A, Ghannadan M, Sperr WR, Valent P, Norderhaug L, Bohle B, Stockinger H, Suphioglu C, Ong EK, Kraft D, Valenta R. A Human Monoclonal IgE Antibody Defines a Highly Allergenic Fragment of the Major Timothy Grass Pollen Allergen, Phl p 5: Molecular, Immunological, and Structural Characterization of the Epitope-Containing Domain. *J Immunol.* 2000;165(7):3849-3859.
49. Vrtala S, Sperr WR, Reimitzer I, Van Ree R, Laffer S, Muller WD, Valent P, Lechner K, Rumpold H, Kraft D, Scheiner O, Valenta R. cDNA cloning of a major allergen from timothy grass (*Phleum pratense*) pollen; Characterization of the recombinant Phl p V allergen. *J Immunol.* 1993;151(9):4773-4781.

50. Matthiesen F, Lowenstein H. Group V allergens in grass pollens. II. Investigation of group V allergens in pollens from 10 grasses. *Clin Exp Allergy*. 1991;21(3):309-320.
51. Klysner S, Welinder KG, Lowenstein H, Matthiesen F. Group V allergens in grass pollens: IV. Similarities in amino acid compositions and NH₂-terminal sequences of the Group V allergens from *Lolium perenne*, *Poa pratensis* and *Dactylis glomerata*. *Clin Exp Allergy*. 1992;22(4):491-497.
52. Petersen A, Becker WM, Schlaak M. Characterization of isoforms of the major allergen Phl p V by two-dimensional immunoblotting and microsequencing. *Int Arch Allergy Immunol*. 1992;98(2):105-109.
53. Göbl C, Focke-Tejkl M, Najafi N, Schrank E, Madl T, Kosol S, Madritsch C, Dorofeeva Y, Flicker S, Thalhamer J, Valenta R, Zangger K, Tjandra N. Flexible IgE epitope-containing domains of Phl p 5 cause high allergenic activity. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;140(4):1187-1191.
54. Rajashankar K, Bufe A, Weber W, Eschenburg S, Lindner B, Betzel C. Structure of the functional domain of the major grass-pollen allergen Phlp 5b. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2002;58(7):1175-1181.
55. Bufe A, Schramm G, Keown MB, Schlaak M, Becker WM. Major allergen Phl p Vb in timothy grass is a novel pollen RNase. *FEBS Lett*. 1995;363(1-2):6-12.
56. Petersen A, Bufe A, Schlaak M, Becker WM. Characterization of the allergen group VI in timothy grass pollen (Phi p 6): I. Immunological and biochemical studies. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995;108(1):49-54.
57. Vrtala S, Fischer S, Grote M, Vangelista L, Pastore A, Sperr WR, Valent P, Reichelt R, Kraft D, Valenta R. Molecular, immunological, and structural characterization of Phl p 6, a major allergen and P-particle-associated protein from Timothy grass (*Phleum pratense*) pollen. *J Immunol*. 1999;163(10):5489-5496.
58. Ledesma A, Villalba M, Batanero E, Rodríguez R. Molecular cloning and expression of active Ole e 3, a major allergen from olive-tree pollen and member of a novel family of Ca²⁺-binding proteins (polcalcins) involved in allergy. *Eur J Biochem*. 1998;258(2):454-459.
59. van Ree R, Hoffman DR, van Dijk W, Brodard V, Mahieu K, Koeleman CAM, Grande M, van Leeuwen WA, Aalberse RC. Lol p XI, a new major grass pollen allergen, is a member of a family of soybean trypsin inhibitor-related proteins. *J Allergy Clin Immunol*. 1995;95(5):970-978.
60. Marknell DeWitt Å, Niederberger V, Lehtonen P, Spitzauer S, Sperr WR, Valent P, Valenta R, Lidholm J. Molecular and immunological characterization of a novel timothy grass (*Phleum pratense*) pollen allergen, Phl p 11. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(9):1329-1340.
61. Sohn RH, Goldschmidt-Clermont PJ. Profilin: At the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton. *BioEssays*. 1994;16(7):465-472.
62. Benítez D, García-Ortega P, Picado C, Milà J, Vives J, Martínez J, Vilella R. Specific immune response to *Phleum pratense* plant profilin in atopic patients and control subjects. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2001;29(1):9-15.
63. Asturias JA, Arilla MC, Gomez-Bayon N, Martinez A, Martinez J, Palacios R. Recombinant DNA technology in allergology: cloning and expression of plant profilins. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 1997;25(3):127-134.
64. Vrtala S, Wiedemann P, Mittermann I, Eichler H, Sperr W, Valent P, Kraft D, Valenta R. High-Level Expression in *Escherichia coli* and Purification of Recombinant Plant Profilins : Comparison of IgE-Binding Capacity and Allergenic Activity Birch profilin (Bet

- v 2) was discovered as a highly cross-reactive allergen by immunoscreening of a. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;50:42-50.
65. Petersen A, Suck R, Hagen S, Cromwell O, Fiebig H, Becker WM. Group 13 grass allergens: Structural variability between different grass species and analysis of proteolytic stability. *J Allergy Clin Immunol.* 2001;107(5 SUPPL.):856-862.
 66. Klimek L, Pfaar O, Bousquet J, Senti G, Kündig T. Allergen immunotherapy in allergic rhinitis: current use and future trends. *Expert Rev Clin Immunol.* 2017;13(9):897-906.
 67. Noon L. Prophylactic Inoculation against Hay Fever. *Lancet.* 1911;1:1572-1573.
 68. Jacobsen L, Niggemann B, Dreborg S, Ferdousi HA, Halken S, Høst A, Koivikko A, Norberg LA, Valovirta E, Wahn U, Möller C. Specific immunotherapy has long-term preventive effect of seasonal and perennial asthma: 10-Year follow-up on the PAT study. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol.* 2007;62(8):943-948.
 69. Wilson D, Torres-Lima M, Durham S. Sub-lingual immunotherapy for allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;106(9):769-775.
 70. Slovick A, Douiri A, Muir R, Guerra A, Tsioulos K, Hay E, Lam EPS, Kelly J, Peacock JL, Ying S, Shamji MH, Cousins DJ, Durham SR, Till SJ. Intradermal grass pollen immunotherapy increases TH2 and IgE responses and worsens respiratory allergic symptoms. *J Allergy Clin Immunol.*
 71. Akdis C, Blaser K. IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. *FASEB J.* 1999;13(6):603-609.
 72. Robinson DS, Larché M, Durham SR. Tregs and allergic disease. *J Clin Invest.* 2004;114(10):1389-1397.
 73. Fujita H, Soyka MB, Akdis M, Akdis CA. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Published online 2012:1-8.
 74. Movérare R. Immunological mechanisms of specific immunotherapy with pollen vaccines: Implications for diagnostics and the development of improved vaccination strategies. *Expert Rev Vaccines.* 2003;2(1):85-97.
 75. Valenta R, Karaulov A, Niederberger V, Zhernov Y, Elisyutina O, Campana R, Focke-Tejkl M, Curin M, Namazova-Baranova L, Wang JY, Pawankar R, Khaitov M. Allergen Extracts for In Vivo Diagnosis and Treatment of Allergy: Is There a Future? *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2018;6(6).
 76. Ackaert C, Kofler S, Horejs-Hoeck J, Zulehner N, Asam C, Von Grafenstein S, Fuchs JE, Briza P, Liedl KR, Bohle B, Ferreira F, Brandstetter H, Oostingh GJ, Duschl A. The impact of nitration on the structure and immunogenicity of the major birch pollen allergen Bet v 1.0101. *PLoS One.* 2014;9(8):1-11.
 77. Focke M, Marth K, Flicker S, Valenta R. Heterogeneity of commercial timothy grass pollen extracts. *Clin Exp Allergy.* 2008;38(8):1400-1408.
 78. Casset A, Mari A, Purohit A, Resch Y, Weghofer M, Ferrara R, Thomas WR, Alessandri C, Chen KW, De Blay F, Valenta R, Vrtala S. Varying allergen composition and content affects the in vivo allergenic activity of commercial dermatophagoides pteronyssinus extracts. *Int Arch Allergy Immunol.* 2012;159(3):253-262.
 79. Georgitis JW, Reisman RE. Venom skin tests in insect-allergic and insect-nonallergic populations. *J Allergy Clin Immunol.* 1985;76(6):803-807.
 80. Van der Veen MJ, Mulder M, Witteman AM, Van Ree R, Aalberse RC, Jansen HM, Van

- der Zee JS. False-positive skin prick test responses to commercially available dog dander extracts caused by contamination with house dust mite (*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 1996;98(6 I):1028-1034.
81. Winther L, Arnved J, Malling HJ, Nolte H, Mosbech H. Side-effects of allergen-specific immunotherapy. A prospective multi-centre study. *Clin Exp Allergy*. 2006;36(3):254-260.
82. Rask C, Lund L, Lund G, Heydenreich B, Wurtzen P, Bellinghausen I, Saloga J, Lund K. An alternative allergen: Adjuvant formulation potentiates the immunogenicity and reduces allergenicity of a novel subcutaneous immunotherapy product for treatment of grass-pollen allergy. *Clin Exp Allergy*. 2012;42(9):1356-1368.
83. Ball T, Linhart B, Sonneck K, Blatt K, Herrmann H, Valent P, Stoecklinger A, Lupinek C, Thalhamer J, Fedorov AA, Almo SC, Valenta R. Reducing allergenicity by altering allergen fold: A mosaic protein of Phl p 1 for allergy vaccination. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2009;64(4):569-580.
84. Valenta R, Kraft D. Recombinant allergen molecules: Tools to study effector cell activation. *Immunol Rev*. 2001;179:119-127.
85. Vrtala S, Fohr M, Campana R, Baumgartner C, Valent P, Valenta R. Genetic engineering of trimers of hypoallergenic fragments of the major birch pollen allergen, Bet v 1, for allergy vaccination. *Vaccine*. 2011;29(11):2140-2148.
86. Vrtala S, Hirtenlehner K, Vangelista L, Pastore A, Eichler H-G, Sperr WR, Valent P, Ebner C, Kraft D, Valenta R. Conversion of the major birch pollen allergen, Bet v 1, into two nonanaphylactic T cell epitope-containing fragments. *J Clin Invest*. 1997;99(7):1673-1681.
87. Vrtala S, Hirtenlehner K, Susani M, Akdis M, Kussebi F, Akdis CA, Blaser K, Hufnagl P, Binder BR, Politou A, Pastore A, Vangelista L, Sperr WR, Semper H, Valent P, Ebner C, Kraft D, Valenta R. Genetic engineering of a hypoallergenic trimer of the major birch pollen allergen, Bet v 1. *FASEB J*. 2001;15(11):2045-2047.
88. Ball T, Linhart B, Sonneck K, Blatt K, Herrmann H, Valent P, Stoecklinger A, Lupinek C, Thalhamer J, Fedorov AA, Almo SC, Valenta R. Reducing allergenicity by altering allergen fold: A mosaic protein of Phl p 1 for allergy vaccination. *Allergy Eur J Allergy Clin Immunol*. 2009;64(4):569-580.
89. Mothes-Luksch N, Stumvoll S, Linhart B, Focke M, Krauth M-T, Hauswirth A, Valent P, Verdino P, Pavkov T, Keller W, Grote M, Valenta R. Disruption of Allergenic Activity of the Major Grass Pollen Allergen Phl p 2 by Reassembly as a Mosaic Protein. *J Immunol*. 2008;181(7):4864-4873.
90. Westritschnig K, Focke M, Verdino P, Goessler W, Keller W, Twardosz A, Mari A, Horak F, Wiedermann U, Hartl A, Thalhamer J, Sperr WR, Valent P, Valenta R. Generation of an Allergy Vaccine by Disruption of the Three-Dimensional Structure of the Cross-Reactive Calcium-Binding Allergen, Phl p 7. *J Immunol*. 2004;172(9):5684-5692.
91. Swoboda I, De Weerd N, Bhalla PL, Niederberger V, Sperr WR, Valent P, Kahlert H, Fiebig H, Verdino P, Keller W, Ebner C, Spitzauer S, Valenta R, Singh MB. Mutants of the major ryegrass pollen allergen, Lol p 5, with reduced IgE-binding capacity: Candidates for grass pollen-specific immunotherapy. *Eur J Immunol*. 2002;32(1):270-280.
92. Vrtala S, Focke M, Kopec J, Verdino P, Hartl A, Sperr WR, Fedorov AA, Ball T, Almo S, Valent P, Thalhamer J, Keller W, Valenta R. Genetic Engineering of the Major Timothy Grass Pollen Allergen, Phl p 6, to Reduce Allergenic Activity and Preserve Immunogenicity. *J Immunol*. 2007;179(3):1730-1739.
93. Toda M, Reese G, Gadermaier G, Schulten V, Lauer I, Egger M, Briza P, Randow S, Wolfheimer S, Kigongo V, Del Mar San Miguel Moncin M, Fötisch K, Bohle B, Vieths S,

- Scheurer S. Protein unfolding strongly modulates the allergenicity and immunogenicity of Pru p 3, the major peach allergen. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;128(5).
94. Rathore AS. Roadmap for implementation of quality by design (QbD) for biotechnology products. *Trends Biotechnol.* 2009;27(9):546-553.
95. Yu LX. Pharmaceutical quality by design: Product and process development, understanding, and control. *Pharm Res.* 2008;25(4):781-791.
96. Bryksin A V., Matsumura I. Rational design of a plasmid origin that replicates efficiently in both gram-positive and gram-negative bacteria. *PLoS One.* 2010;5(10).
97. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-254.
98. Jin M, Szapiel N, Zhang J, Hickey J, Ghose S. Profiling of host cell proteins by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE): Implications for downstream process development. *Biotechnol Bioeng.* 2010;105(2):306-316.
99. Miles; Hales. Labelled antibodies and immunological assay systems. *Nature.* 1968;219:186-189.
100. Johnson WC. Protein Secondary Structure and Circular Dichroism : A Practical Guide. *PROTEINS Struct Funct Genet.* 1990;7:205-214.

