

OPTIMIZACIÓN DE UN ELISA SANDWICH ÚTIL PARA LA EVALUACIÓN FARMACOCINÉTICA DE VARIANTES HIPERGLICOSILADAS DE ERITROPOYETINA HUMANA

Valentina Wandel Petersen¹

¹Laboratorio de Cultivos Celulares, Centro Biotecnológico del Litoral (CBL), FBCB-UNL

Directora: Bürgi Fissolo, María de los Milagros

Codirector: Oggero Eberhardt, Marcos Rafael

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: ELISA, hEPO, Farmacocinética

INTRODUCCIÓN

Impulsados por la creciente búsqueda de moléculas útiles para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, nuestro grupo de trabajo innovó en la producción de entidades neuroprotectoras y neuroplásticas derivadas de eritropoyetina humana (hEPO) mediante tecnología de glicoingeniería por hiperglicosilación (Bürgi y col., 2021). Los análogos Mut 45_47 y Mut 151_153 de hEPO incorporaron sitios adicionales de N-glicosilación en aminoácidos críticos de la molécula, responsables de su actividad eritropoyética, permitiendo el bloqueo de la misma sin afectar su accionar orientado a la neuroactividad. Dichas moléculas han sido previamente caracterizadas restando la evaluación de su comportamiento farmacocinético. Este aspecto es de gran relevancia para candidatos terapéuticos que deban administrarse en el tratamiento de patologías crónicas como son las enfermedades neurodegenerativas. De acuerdo con lo recomendado por la Farmacopea internacional, el análisis farmacocinético de hEPO recombinante (rhEPO) -inyectada en animales de experimentación- se realiza mediante la evaluación de su actividad eritropoyética *in vitro*. No obstante, dado que estas variantes de rhEPO fueron generadas con el objetivo de bloquear dicha actividad, no resulta posible su análisis farmacocinético empleando tal determinación. Frente a esta problemática, en el presente trabajo, se llevó a cabo la optimización de un ELISA sándwich (ES), previamente desarrollado en nuestro laboratorio, con el objetivo de obtener un ensayo con un adecuado límite de detección que permita llevar a cabo los estudios farmacocinéticos de las variantes hiperglicosiladas Mut 45_47 y Mut 151_153 en muestras complejas como lo es el plasma de ratas.

OBJETIVOS

- Disponer de un ensayo tipo ELISA sándwich optimizado que presente un bajo límite de detección, útil para cuantificar rhEPO y sus variantes hiperglicosiladas en el plasma de animales de experimentación.
- Evaluar las propiedades farmacocinéticas de las variantes hiperglicosiladas de hEPO empleando el ensayo optimizado.

Título del proyecto: NEUROPLASTICIDAD Y NEUROPROTECCIÓN SIN HEMATOPOYESIS: PROPIEDADES CLAVE DE UNA NUEVA ERITROPOYETINA HIPERGLICOSILADA

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2019

Organismo financiador: Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT), Ministerio de Ciencia y Tecnología (MinCyT)

Director/a: Oggero Eberhardt, Marcos Rafael

METODOLOGÍA

El ES disponible en el laboratorio para la cuantificación de rhEPO y de sus variantes hiperglicosiladas, está conformado por:

- i. un anticuerpo monoclonal (mAb) anti-rhEPO como anticuerpo (Ac) de captura ($100 \text{ ng} \cdot \text{pozo}^{-1}$)
- ii. un segundo anticuerpo presente en un suero de conejo anti-rhEPO (diluido 1:2000) que forma el sistema sándwich, una vez que el antígeno (rhEPO o análogo) es captado por el mAb empleado como captura.
- iii. un tercer Ac de detección (suero de cabra anti-inmunoglobulinas (Ig) de conejo conjugado con la enzima peroxidasa (HRP) diluido 1:2000)
- iv. el sustrato de la enzima (agua oxigenada) en presencia de *o*-fenilendiamina.

No obstante, debido a que el límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) de este sistema no resultan adecuados para efectuar la cuantificación de las variantes de hEPO durante su análisis farmacocinético, y dado que ambos parámetros están estrechamente vinculados, se propuso mejorarlos mediante el enfoque metodológico de análisis *One Variable At a Time* (OVAT), evaluando la sensibilidad del ensayo frente al empleo de distintas concentraciones y diluciones de los tres Ac que conforman el ensayo. Para ello, se analizaron 5 concentraciones del estándar de rhEPO ($n=2$) desde $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ en diluciones sucesivas 1:2; distintas masas del Ac de captura (62,5; 125; 250 y $500 \text{ ng} \cdot \text{pozo}^{-1}$) y distintas diluciones del suero anti-rhEPO (1:250, 1:500, 1:1000 y 1:2000), manteniendo constante la dilución del Ac conjugado (1:2000). A partir de estos ensayos, la condición más favorable fue seleccionada para evaluar la dilución del Ac conjugado empleada habitualmente, y compararla con la respuesta obtenida al utilizar una dilución menor (1:500).

Para constatar la utilidad del ES optimizado en el monitoreo de las propiedades farmacocinéticas de la citoquina, se comparó el perfil farmacocinético de rhEPO cuantificada mediante el ES optimizado con el perfil obtenido a partir del ensayo de valoración *in vitro* de la actividad biológica eritropoyética empleando células eritroides UT7, que requieren de hEPO para su proliferación y que constituyen el ensayo de referencia para medir dicha actividad.

Por otro lado, con el objetivo de caracterizar el ES optimizado, se determinaron las cifras de mérito: rango de respuesta lineal (RL), sensibilidad (SEN), LoD, límite de cuantificación (LoQ), reproducibilidad (precisión intraensayo) y repetitividad (precisión interensayo), estos dos últimos medidos como coeficientes de variación porcentuales (CV%) de acuerdo con la definición vigente de la IUPAC (Olivieri, 2015) y a las recomendaciones de las guías de validación de métodos bioanalíticos de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, Smith, 2012).

Finalmente, con el propósito de evaluar los parámetros farmacocinéticos de las variantes de hEPO, se realizaron experimentos *in vivo* empleando ratas Wistar de tres meses de edad. Se conformaron 3 grupos los cuales fueron inoculados ($n=4$) vía intraperitoneal con una única dosis de $100 \mu\text{g}$ de las moléculas Mut 45_47, Mut 151_153 y rhEPO (control). Se extrajeron muestras de sangre a diferentes tiempos posinyección (1 h, 4 h, 7 h, 10 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h y 120 h). La cuantificación de la citoquina en las muestras biológicas se realizó mediante el ES optimizado. Con los datos obtenidos, se graficaron los perfiles farmacocinéticos y se calcularon los parámetros: máxima concentración plasmática alcanzada ($C_{m\acute{a}x}$), tiempo necesario para alcanzar dicha concentración ($T_{m\acute{a}x}$), *clearance* aparente (Cl_{app}), tiempo de vida media de la proteína en circulación plasmática ($t_{1/2elim}$) y área bajo la curva (AUC); empleando la metodología descrita por Gugliotta (2016). Los resultados se expresaron como el valor promedio \pm la desviación estándar (SD) de los datos obtenidos ($n=4$). El tratamiento estadístico se realizó empleando el análisis de la varianza (ANOVA) y posterior prueba de comparación múltiple de Tukey, a excepción del parámetro $T_{m\acute{a}x}$, el cual se comparó mediante la prueba no paramétrica Wilcoxon-Mann-Whitney. En todos los casos, se consideró la existencia de diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

En virtud de los resultados obtenidos en la optimización mediante OVAT, se definió el nuevo protocolo del ES optimizado en el cual se incrementó 5 veces la masa del Ac de captura, se duplicó la concentración del Ac que cierra el sándwich y se cuadruplicó la concentración del Ac conjugado a HRP (Tabla 1).

La curva dosis-respuesta del ES optimizado exhibió un RL de respuesta de rhEPO entre 3,1 – 400 ng·mL⁻¹ (p = 0,228). Asimismo, mediante el proceso de optimización, se logró incrementar la SEN del ensayo 1,6 veces (2,1 DO·mL·ng⁻¹) y mejorar 10 veces el LoD (0,3 ng·mL⁻¹) y el LoQ (0,8 ng·mL⁻¹) en comparación al ES en su condición inicial. Por otro lado, los CV% obtenidos demostraron que se trata de un ensayo preciso y reproducible a lo largo de todo el rango de análisis.

La utilidad del ES optimizado en el monitoreo de rhEPO en plasma de animales de experimentación quedó demostrada al comparar los perfiles farmacocinéticos construidos a partir de la cuantificación de las muestras a través del ES optimizado y mediante el método de referencia de actividad biológica eritropoyética (Fig. 1). De este modo, se confirmó que el ensayo optimizado resulta útil para el estudio de bajas concentraciones de rhEPO en muestras complejas como lo es el plasma de ratas. Por su parte, la Fig. 2 ejemplifica la cuantificación mediante ES optimizado de la Mut 151_153 en muestras de plasma extraídas a distintos tiempos posinyección.

Tabla 1. Comparación del ES optimizado con la versión inicial del mismo desarrollado en nuestro laboratorio

| Reactivo | ES inicial | ES optimizado |
|---|---------------------------|---------------------------|
| Ac de captura (mAb anti-rhEPO) | 100 ng·pozo ⁻¹ | 500 ng·pozo ⁻¹ |
| Suero anti-rhEPO | dil 1:2000 | dil 1:1000 |
| Ac de detección anti-Ig de conejo conjugado a HRP | dil 1:2000 | dil 1:500 |

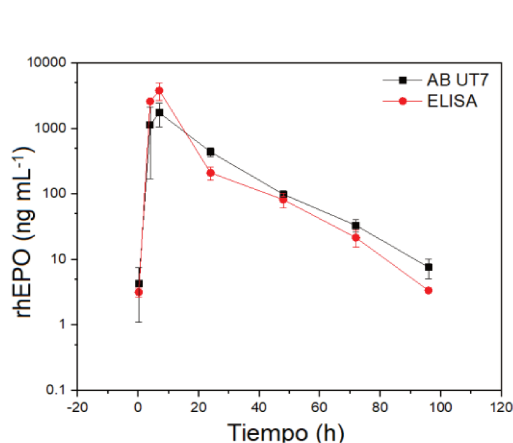


Fig. 1 Perfil farmacocinético de rhEPO mediante su cuantificación empleando el ensayo convencional de actividad biológica eritropoyética (AB UT7) y el ES sándwich

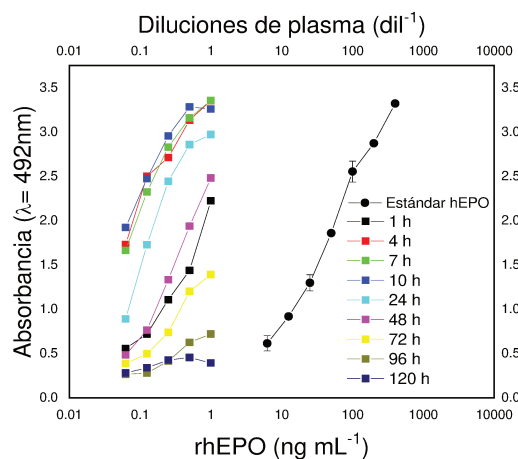


Fig. 2 Cuantificación mediante el ES optimizado de la Mut 151_153 en muestras de plasma extraídas a distintos tiempos posinyección.

A partir del análisis farmacocinético de rhEPO y sus variantes, se puede observar que los perfiles obtenidos difieren principalmente en la fase de eliminación, comprendida aproximadamente entre las 4 y las 120 h posteriores a la administración de la proteína en estudio (Fig. 3). La Mut 151_153 exhibió un incremento de 1,6 veces comparado a la $C_{m\acute{a}x}$ obtenida para rhEPO (p=0,03), a diferencia de la Mut 45_47 que no demostró diferencias significativas con el grupo control. Para ambas variantes en estudio, no se obtuvieron diferencias en cuanto al $T_{m\acute{a}x}$. En conjunto, estos resultados indican un

comportamiento similar en la fase de absorción de dichas moléculas. En cuanto a la fase de eliminación, se observó que la Mut 45_47 presentó un $t_{1/2elim}$ 1,5 veces mayor al de rhEPO ($p=0,04$), lo cual, junto con el incremento observado en el AUC de esta variante, denotan una menor velocidad de eliminación en comparación con rhEPO. Por el contrario, la variante Mut 151_153 no mostró diferencias significativas en estos parámetros con respecto a la condición control. En lo que refiere al Cl_{app} de las moléculas se observa que el incremento en el grado de glicosilación en ambas variantes condujo a una disminución en la velocidad de depuración plasmática. En particular, para la Mut 45_47 este efecto fue más notorio, lográndose una reducción del Cl_{app} de 2,3 veces en comparación con rhEPO; característica que la convierte en un candidato prometedor como bioterapéutico (Tabla 2).

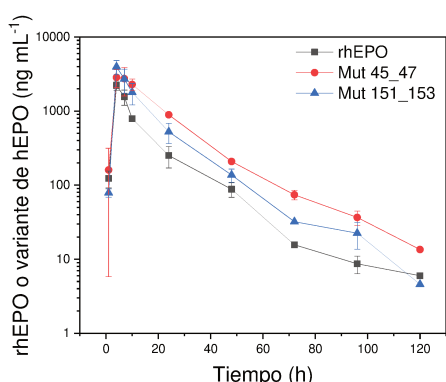


Fig. 3 Perfiles farmacocinéticos obtenidos para rhEPO y sus variantes Mut 45_47 y Mut 151_153.

Tabla 2 Parámetros farmacocinéticos de rhEPO y de sus variantes hiperglicosiladas Mut 45_47 y Mut 151_153.

| Muestra | $C_{máx}$ (ng·mL ⁻¹) | $T_{máx}$ (h) | $t_{1/2elim}$ (h) | AUC (ng·h·mL ⁻¹) | Cl_{app} (mL·h ⁻¹) |
|-------------|-------------------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| rhEPO | 1297 ± 163 | 4,7 ± 0,7 | 10 ± 1 | 28296 ± 7255 | 3,7 ± 0,9 |
| Mut 45_47 | 2064 ± 467 ($p=0,09$) | 6 ± 0,1 ($p=0,14$) | 15 ± 1 ($p=0,04$) | 61205 ± 10038 ($p=0,04$) | 1,6 ± 0,3 ($p=0,03$) |
| Mut 151_153 | 2453 ± 346 ($p=0,03$) | 2,3 ± 0,3 ($p=0,15$) | 11 ± 2 ($p=0,99$) | 49566 ± 14885 ($p=0,14$) | 2,1 ± 0,6 ($p=0,05$) |

De esta manera, mediante el ES optimizado se cuantificaron de modo confiable y reproducible las muestras plasmáticas de rhEPO y de sus nuevas variantes hiperglicosiladas. Esto a su vez, permitió obtener perfiles farmacocinéticos útiles para demostrar que la estrategia de glicoingeniería por hiperglicosilación - adoptada con el objetivo de bloquear la acción hematopoyética de rhEPO - resultó ser, además, un procedimiento adecuado para extender la circulación de las moléculas en plasma. Particularmente, la variante Mut 45_47, debido a su prolongado tiempo de vida media en circulación y su menor *clearance* plasmático, resultaría un candidato prometedor para ser explorado como neuroterapéutico, considerando no sólo su función biológica, sino además las ventajas farmacocinéticas adquiridas gracias al sitio adicional de N-glicosilación.

Finalmente, la optimización del ES constituye un procedimiento de relevancia para reemplazar un método de bajo límite de detección, como es la evaluación de la actividad eritropoyética *in vitro*, para aquellas moléculas derivadas de hEPO que carecen de esta actividad.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Bürgi, M., Aparicio, G. I., Dorella, A., Kratje, R., Scorticati, C., & Oggero, M., 2021. Novel erythropoietin-based therapeutic candidates with extra N-glycan sites that block hematopoiesis but preserve neuroplasticity. *Biotechnol J*, 16(5):e2000455. doi: 10.1002/biot.202000455.
- Gugliotta A., 2016. Diseño y optimización de un proceso de producción de muteínas de interferón- $\alpha 2b$ humano con mayor actividad biológica mediante glicosilación en células de mamífero. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. Argentina.
- Olivieri, A. C., 2015. Practical guidelines for reporting results in single- and multi-component analytical calibration: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 868, 10–22.
- Smith, G., 2012. European Medicine's Agency guideline on bioanalytical method validation: What more is there to say? *Bioanalysis*, 4(8): 865–868.