

RESEARCHS / INVESTIGACIÓN

Determinación del coeficiente de absorptividad específico del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante.

Determination of the specific absorptivity coefficient of the recombinant human epidermal growth factor.

Vivian Morera Córdova.

DOI. 10.21931/RB/2018.03.04.5

Resumen: Se determina el coeficiente de absorptividad específico del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (EGFhr) mediante una metodología que utiliza la técnica de análisis de aminoácidos como método de cuantificación de las proteínas. Se empleó la albúmina de suero bovino (BSA) como proteína modelo para la evaluación de la ejecución de la metodología. Se demostró mediante análisis estadístico de los resultados que el coeficiente de absorptividad específico de la proteína modelo coincide con alta precisión con el valor informado para esta proteína en la literatura. La metodología implementada se aplicó al EGFhr que contiene dos especies proteicas de 51 y 52 aminoácidos. El valor del coeficiente de absorptividad específico de las dos especies no presenta diferencias y puede considerarse un único valor, lo cual resulta de mucha utilidad en el contexto productivo y de desarrollo de un producto biofarmacéutico.

Palabras Claves: cuantificación, albúmina bovina de suero, factor de crecimiento epidérmico y coeficiente de absorptividad específico.

Abstract: The specific absorptivity coefficient of the recombinant human epidermal growth factor (EGFhr) was determined by a methodology that uses the technique of amino acid analysis as a method of protein quantification. Bovine serum albumin (BSA) was used as a model protein for the evaluation of the execution of the methodology. It was demonstrated by statistical analysis of the results that the coefficient of specific absorptivity of the model protein coincides with high precision with the value reported for this protein in the literature. The methodology implemented was applied to EGFhr that contains two protein species of 51 and 52 amino acids. The value of the coefficient of specific absorptivity of the two species does not present differences and can be considered as a single value, which is very useful in the productive and development context of a biopharmaceutical product.

KeyWords: quantification, serum bovine albumin, epidermal growth factor and specific absorptivity coefficient.

Introducción

El conocimiento del coeficiente de absorptividad molar de los productos biofarmacéuticos de origen proteico es fundamental. Esta constante físico química se emplea en la medición de la concentración de proteína en las distintas etapas del proceso productivo, ya sea para estimar el rendimiento del producto durante su producción o para evaluar su potencia y por lo tanto llevar a cabo una formulación correcta¹.

En la determinación experimental del coeficiente de absorptividad de una proteína el paso crítico es la determinación de la concentración de la solución de proteína. Los métodos empleados con mayor frecuencia para la determinación de la concentración de soluciones de proteína son: análisis de aminoácidos^{2, 3}, determinación de nitrógeno total por el método de Kjeldahl⁴, el método de peso seco^{5, 6, 7}, el método de Edelhoch⁸ y los métodos colorimétricos como las técnicas de Bradford y del ácido bicinonónico (BCA)^{9, 10}. De estos, la técnica de análisis de aminoácidos es el método más preciso y directo, con excelente linealidad y reproducibilidad, no depende de la abundancia en la proteína de residuos aromáticos, no emplea proteínas de referencia y es un método preciso a bajas concentraciones de proteína. Adicionalmente el método también se utiliza como criterio de identificación molecular de proteínas en bases de datos¹¹.

Los otros métodos para determinar la concentración de una solución de proteína son útiles cuando se trata

de muestras con altas concentraciones de proteína. Sin embargo, la utilidad está limitada ya que algunos dependen del contenido de aminoácidos aromáticos, el error asociado a ellos es considerable y dependen de la comparación con un estándar conocido de proteína. Por otra parte, las técnicas de ligandos coloreados tienen un rango dinámico limitado lo que hace que se tengan que preparar y analizar diluciones a partir de la muestra problema hasta que la concentración se ubique dentro de la curva de calibración realizada.

A pesar de las evidentes ventajas de la técnica de análisis de aminoácidos la mayoría de los coeficientes de absorptividad informados en la literatura están determinados por métodos predictivos o son el resultado de determinaciones experimentales que emplean métodos de cuantificación de proteínas diferentes a la técnica de análisis de aminoácidos. Una explicación de esta contradicción se basa en el hecho de que la técnica de análisis de aminoácidos requiere de equipamiento costoso, de la ejecución de la técnica por un analista experimentado, del control de las posibles fuentes de contaminación y es un procedimiento trabajoso.

La metodología para la determinación del coeficiente de absorptividad específico de proteínas implementada comprende la preparación de soluciones seriadas de la proteína pura, la determinación de la concentración de las soluciones y la medición de la absorbancia a 280 nm. La pendiente de la

¹ Universidad de Investigación de Tecnología Experimental Yachay. Escuela de Ciencias Químicas e Ingeniería. San Miguel de Urququí. Hacienda San José s/n. Imbabura, Ecuador.

recta de la regresión lineal de la absorbancia en función de la concentración es el coeficiente de absorptividad específico (a). Con el propósito de minimizar el sesgo en los resultados estos ensayos son realizados con réplicas y en días diferentes¹².

En este trabajo se informa el coeficiente de absorptividad específico del EGFhr determinado empleando la técnica de análisis de aminoácidos para la determinación de la concentración de proteína. La metodología se implementó empleando una proteína modelo, la BSA, de concentración, composición aminoacídica y coeficiente de absorptividad conocidos. Esto permitió evaluar la exactitud y la precisión de la metodología implementada.

Materiales y métodos

BSA: para la evaluación de la exactitud y precisión de la metodología empleamos BSA (Pierce, EEUU). A partir de la preparación comercial se prepararon diluciones seriadas a 0.80, 0.60, 0.40 y 0.20 mg/mL en agua. A cada una de estas soluciones se le midió la absorbancia a 280 nm y se determinó la concentración de proteínas mediante la técnica de análisis de aminoácidos. Los experimentos se realizaron tres veces en días independientes y por triplicado para cada solución de trabajo. Para el cálculo de la concentración de proteína se empleó el valor de peso molecular de 66 430 Da.

EGFhr: partimos de una solución de proteína a una concentración estimada de 0.71 mg/mL con pureza estimada por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa de 97.73%. Esta preparación contiene dos especies proteicas, las cuales se denominan en este trabajo EGFhr-51 y EGFhr-52 y tienen una masa molecular teórica de 5952 Da y 6065 Da, respectivamente.

Cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa: la purificación de las especies del EGFhr se llevó a cabo en una columna de fase reversa C18 (Vydac, EEUU) de dimensiones 10 x 250 mm. Se empleó un controlador de gradiente LKB 2152 (Farmacia, Suecia) el cual regula el funcionamiento de dos bombas LKB 2150 (Farmacia, Suecia). La temperatura de la columna se mantuvo constante en 37°C por medio de un horno (Knauer, Alemania). Para la elusión de las muestras se utilizó un gradiente entre la solución A: ácido trifluoroacético (Pierce, EEUU) al 0.1% en agua MilliQ y la solución B: ácido trifluoroacético (Pierce, EEUU) al 0.05% en acetonitrilo (Merck, Alemania). El gradiente empleado fue: de 0 a 10 min 20% de B, a los 12 min 25% de B, a los 60 min 32% de B, a los 66 min 20% de B y a los 96 min 2% de B. El flujo de trabajo fue de 0.8 mL/min. Ambos solventes se desgasificaron con un desgasificador ERC 3310 (Erma, Japón). La detección se realizó a 226 nm utilizando un monitor de longitud de onda variable LKB 2151 (Farmacia, Suecia). Estimación de la concentración de proteína: la determinación preliminar de la concentración de proteína de las soluciones de las especies EGFhr-51 y EGFhr-52 se realizó mediante la técnica colorimétrica de BCA. Se empleó el protocolo en placas de 96 huecos del sistema comercial BCA Protein Assay Kit (Pierce, EEUU). La curva patrón se construyó con soluciones de diferente concentración en el rango de 0.15 a 1.66 mg/mL de la preparación comercial de BSA. Las determinaciones se realizaron por triplicado. La lectura se realizó a 580 nm.

Solución de norleucina (nLeu): en un tubo Eppendorf de 1.5 mL se pesaron 1.40 mg de nLeu y se disolvieron en 1.30 mL de solución tampón de carga (pH 2.23 y citrato de litio 0.20 mol/L) al analizador automático de aminoácidos (Biochrom Ltd Cambridge Amersham-Pharmacia, Inglaterra). La concen-

tración final de esta solución es 8.83 nmol/ μ L.

Soluciones de trabajo de EGFhr-51 y EGFhr-52: las proteínas puras se disolvieron en agua libre de aminoácidos y se estimó la concentración de proteína por el método colorimétrico de BCA. A partir de estas soluciones se prepararon las diluciones seriadas de trabajo a concentraciones de 0.80, 0.60, 0.40 y 0.20 mg/mL. A cada una de estas soluciones se le midió la absorbancia a 280 nm y se realizó la determinación de la concentración de proteína mediante la técnica de análisis de aminoácidos. Este procedimiento fue realizado dos veces en días independientes y por duplicado para cada solución de trabajo. Las soluciones de trabajo fueron preparadas en el momento de realizar los experimentos.

Muestras para análisis de aminoácidos: en el caso de la BSA se mezclaron volúmenes de las soluciones de trabajo y de la solución de nLeu en una relación molar 1:36 y se evaporaron en evaporador rotatorio a sequedad en ampollitas de vidrio previamente pirolizadas. En el caso de EGFhr-51 y EGFhr-52 la relación molar con el estándar interno nLeu fue de 1:2 e igualmente estas mezclas se evaporaron mediante el procedimiento antes descrito.

Hidrólisis ácida total: a las ampollitas de vidrio que contenían las muestras secas se añadieron 100 μ L de HCl 6N, conteniendo 0.1% de 2-mercaptoetanol y 0.1% de fenol. Se sellaron a vacío mientras se mantenían sumergidas en nitrógeno líquido y se hidrolizaron a 110 °C por 24 horas. La mezcla de hidrólisis se secó a vacío en evaporador rotatorio y los aminoácidos libres se redisolviéron en 120 μ L de la solución tampón de aplicación al analizador.

Estándar de aminoácidos libres: el estándar de aminoácidos libres empleado para la calibración del analizador automático y la cuantificación de los hidrolizados de las proteínas es una solución comercial (Pierce, EEUU) que contiene todos los α -aminoácidos a una concentración de 500 nmol/mL, excepto cistina que está a una concentración de 250 nmol/mL. Se inyectaron en cada cápsula 20 μ L o sea 10 nmol de cada α -aminoácido y 5 nmol de cistina.

Cromatografía de intercambio iónico: se empleó un analizador automático Biochrom 20 (Biochrom Ltd Cambridge, Amersham-Pharmacia, Inglaterra). Los aminoácidos libres de los hidrolizados de las proteínas se separaron mediante cromatografía de intercambio iónico en una columna de alta eficiencia (4.6 x 150 mm y 9+/- 0.5 μ m de tamaño de partícula) rellena con un intercambiador catiónico, utilizando iones litio como contraión. La elusión se realizó con una serie de soluciones tampón de diferente pH y fuerza iónica según las instrucciones del fabricante. La obtención post-columna de los derivados coloreados se realizó mediante la reacción con ninhidrina y la detección de los derivados se realizó a 570 nm y 440 nm. Los residuos aminoacídicos se identificaron por su tiempo de retención mediante la comparación con el estándar de aminoácidos libres analizado en idénticas condiciones. La adquisición y procesamiento de los datos se realizó con el programa PEAK MASTER versión 4.10 (HARLEY SYSTEMS, Inglaterra).

Cálculo de la cantidad de proteína analizada (CPA): el cálculo de la cantidad de proteína presente en el análisis se realizó dividiendo la cantidad detectada (nmol) en el análisis entre el valor teórico de residuos para determinado aminoácido en la secuencia de la proteína. Los valores teóricos por residuo aminoacídico se tomaron de la secuencia de aminoácidos de las especies del EGFhr y la BSA, respectivamente.

Control de la cuantificación por análisis de aminoácidos: como control de la técnica se realizó la determinación de la concentración de proteína a la BSA sin diluir y se empleó nLeu

como estándar interno. Para la hidrólisis se prepararon ampollitas de vidrio pirolizadas que contenían 3 nmol (199.26 µg) de BSA y 110.37 nmol (12.45 µg) de nLeu. Igualmente, esta mezcla se evaporó en evaporador rotatorio. El experimento se realizó por triplicado.

Espectrofotometría: la absorbancia de las soluciones de trabajo de BSA y de EGFhr-51 y EGFhr-52 se determinó en un espectrofotómetro Spectronic Génesis 2 (Spectronic Instruments, Alemania) empleando 1 mL de cada solución de trabajo, en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. La lectura de la densidad óptica de las soluciones de trabajo se realizó a 280 nm contra el solvente empleado para su disolución (agua).

Evaluación estadística de los resultados

El método desarrollado para combinar los resultados de los distintos experimentos está basado en la combinación de dos procedimientos empleados para diferentes fines: el primero, es la estimación de una pendiente común a partir de la combinación de los pares de valores de abscisas y ordenadas de las regresiones independientes¹³. El segundo, es sopesar la combinación de las pendientes de acuerdo a la precisión de la estimación de las pendientes a promediar y si existen diferencias estadísticas significativas entre ellas o no¹⁴.

El método consiste en determinar las pendientes de las diferentes réplicas experimentales empleando pesos iguales a la unidad. Después de obtener las pendientes para cada una de las réplicas se obtiene la regresión combinada de las réplicas que forman parte de un mismo experimento (día de ensayo). Para ello, el primer paso consiste en determinar si existen diferencias significativas entre las pendientes que se promedian mediante una prueba donde se compara el incremento del cuadrado medio residual de la regresión conjunta sopesada, causado por el uso de una sola pendiente, con el cuadrado medio residual combinado de las regresiones independientes¹⁵. Cuando no existen diferencias significativas entre las pendientes los pesos de los puntos de cada una de las réplicas se calculan como el inverso del cuadrado medio residual de la regresión de esa réplica, normalizado a la media de los pesos. En caso de detectarse diferencias significativas entre las regresiones a promediar los pesos se calculan como el inverso de la suma del cuadrado medio residual de esa réplica y el cuadrado medio residual entre las réplicas, normalizando también a la media. En el caso de diferencias significativas entre las réplicas, la diferencia entre los coeficientes de peso para los diferentes puntos es atenuada por la existencia de un término común en el denominador: el cuadrado medio de la diferencia entre pendientes. Los pesos fueron normalizados en todos los casos para permitir la comparación posterior de las pendientes obtenidas para cada uno de los ensayos. Los resultados de los ensayos fueron promediados de forma idéntica a la ya descrita para promediar las réplicas.

En el caso del cálculo del coeficiente de absorptividad específico del EGFhr, se obtuvieron de forma independiente los resultados para el EGFhr-51 y el EGFhr-52 y luego fueron promediados entre ellos. En este caso, la comparación de las pendientes obtenidas para cada una de las especies se empleó como criterio de igualdad entre sus coeficientes de extinción. La media fue calculada siguiendo el mismo procedimiento. Con el fin de evaluar el método experimental y la calidad de los resultados, se calcularon los coeficientes de variación intra-réplica, entre réplicas y entre ensayos, así como los límites de confianza de la pendiente estimada para cada caso.

Resultados y discusión

Control de la cuantificación de proteínas por análisis de aminoácidos

Para evaluar la exactitud de la determinación de la concentración de proteína se seleccionó una preparación comercial, de concentración conocida: la BSA. Como control interno del proceso de cuantificación se empleó un aminoácido no común en la estructura de las proteínas: la norleucina. Este aminoácido es estable durante la hidrólisis ácida y puede ser cromatográficamente separado del resto de los aminoácidos proteicos. El empleo de este estándar interno permite valorar la recuperación del material proteico al finalizar el procedimiento completo de hidrólisis y minimizar la variabilidad entre las determinaciones. En el cálculo de la concentración de proteína se consideraron la recuperación del estándar interno, las diluciones realizadas y los volúmenes de partida.

En el experimento empleamos un único método de hidrólisis. Todos los residuos aminoacídicos fueron detectados con este método excepto Met, Cys y Trp. Para el cálculo de la CPA se consideró el rendimiento de Asx, Glx, Ala, Val, Ile, Leu, Tyr y Phe y se calculó la CPA promedio. Los resultados de la determinación de la concentración de la preparación comercial de BSA sin diluir (Tabla 1). La exactitud de la determinación aparece expresada mediante la desviación estándar, el coeficiente de variación porcentual y el error porcentual, este último calculado con relación al valor teórico de la concentración de la preparación comercial de BSA. Usualmente el coeficiente de variación porcentual es considerado aceptable hasta el 10%¹⁶. El valor de concentración experimental promedio 2.02 mg/mL coincide de manera satisfactoria con el valor teórico 2.00 mg/mL; este resultado demuestra que la cuantificación de proteínas mediante la técnica de análisis de aminoácidos resulta precisa y fiable para la determinación del coeficiente de absorptividad específico de proteínas.

Teóricamente el rendimiento de un solo aminoácido presente en una muestra de proteína recombinante, cuyas composiciones aminoacídicas y masa molecular son bien conocidas, puede ser suficiente para la determinación de la concentración. Sin embargo, el uso del rendimiento promedio de varios residuos, especialmente de aquellos con un comportamiento más estable durante la hidrólisis ácida, garantiza la cuantificación con mayor exactitud y permite ponderar el comportamiento particular de los diferentes aminoácidos en el análisis cuantitativo.

El método de hidrólisis empleado es el más común para hidrolizar proteínas, previo al análisis de sus aminoácidos constituyentes. Sin embargo, la técnica de hidrólisis ácida puede contribuir significativamente a la variación de los resultados del análisis debido a las diferencias en la estabilidad de los aminoácidos que se encuentran en las proteínas. Algunos residuos como Cys y Trp son completamente degradados bajo las condiciones ácidas de hidrólisis y la Met su oxida. Por otra parte, Ser y Thr son significativamente degradados (>30%) durante la hidrólisis. En los resultados del análisis de aminoácidos influyen además los fondos que aportan los aminoácidos libres provenientes de las más diversas fuentes, en particular Gly, Ser y Ala, observándose para los residuos afectados un aumento en el valor experimental y en el coeficiente de variación. Estos residuos aminoacídicos no se recomiendan para el análisis cuantitativo. La técnica de análisis de aminoácidos debe ser rigurosamente controlada en cada laboratorio de manera que estas particularidades no tengan un mayor impacto

en la cuantificación de las proteínas por sobreestimación o subvaloración de las cantidades reales. El grupo de aminoácidos seleccionados para el cálculo de la CPA resultó adecuado y permite calcular la concentración de una solución de proteína con un 0.83% de error (Tabla 1).

Para determinar el coeficiente de absorptividad de proteínas con escaso grado de caracterización empleando la técnica de análisis de aminoácidos para la cuantificación, es necesario emplear una batería de métodos especializados junto a la hidrólisis con ácido clorhídrico 6N para la determinación cuantitativa de todos los aminoácidos presentes en la secuencia de la proteína^{17,18}. Esta estrategia aumenta considerablemente el número de muestras a analizar, el tiempo de trabajo y los costos del experimento.

Determinación del coeficiente de absorptividad específico de proteínas

Albúmina bovina de suero: proteína modelo

La metodología empleada para la determinación del coeficiente de absorptividad específico de las proteínas comprende la determinación precisa de la concentración de soluciones de proteína de diferente concentración mediante la técnica de análisis de aminoácidos y la medición de sus absorbancias a 280 nm. Los datos de la concentración para cada solución de proteína se correlacionan con su absorbancia, se determina la pendiente de la relación lineal en el rango de concentraciones estudiadas y esa pendiente es la constante de absorptividad específica¹².

El coeficiente de absorptividad específico de la BSA se determinó a partir de soluciones de trabajo obtenidas por dilución seriada de la preparación comercial. Para el cálculo de la concentración de proteína de cada solución de trabajo se empleó como base de cálculo de la CPA el mismo grupo de aminoácidos empleados en el control de la cuantificación de la BSA sin diluir. Se realizaron tres experimentos en días diferentes (día 1, día 2 y día 3) y 3 réplicas para cada solución de trabajo por experimento. Este diseño permitió calcular la variación de los resultados dentro del curso del mismo análisis y la variación interdía, ambas constituyen criterios de precisión de la metodología. En la tabla 2 se presentan los resultados del cálculo de la pendiente para cada réplica, para cada ensayo y la media de los 3 experimentos realizados. Se indica además si se observaron diferencias significativas o no entre los resultados a promediar. Las diferencias significativas observadas entre las réplicas del tercer ensayo y entre los resultados de los ensayos demuestran la utilidad de realizar varios ensayos con réplicas en cada uno, a fin de evitar el sesgo en los resultados. La precisión de los resultados se evaluó mediante el coeficiente de variación (Tabla 3). En todos los casos el CV es menor que 2%, menor que el de las técnicas analíticas empleadas de forma rutinaria en la cuantificación de proteínas¹⁶.

El valor de coeficiente de absorptividad específico para la BSA determinado experimentalmente en este trabajo, $0.6758 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, se comparó con otros valores informados en la literatura. Wetlaufer¹⁹ predijo un as de $0.6607 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Gill y von Hippel²⁰ predijeron un as de $0.6517 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y Pace y colaboradores²¹ un as de $0.6462 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, aproximadamente 2.2%, 3.6% y 4.4% menores que nuestro resultado experimental, respectivamente. Nozaki determinó el as de BSA empleando concentraciones calculadas por el método de peso seco y el valor obtenido fue $0.6257 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, que se diferencia aún más de nuestro resultado experimental: -7.4%²².

Estos datos indican que los métodos predictivos y el método de peso seco sobreestiman la concentración de BSA y

consecuentemente aportar valores de as inferiores. La determinación de concentración mediante el método de peso seco puede sobreestimar el valor de concentración debido a la presencia de sales no volátiles o de moléculas de agua enlazadas a moléculas de proteína. Los modelos predictivos de Gill y von Hippel²⁰ y Pace y colaboradores²¹ emplean coeficientes de absorptividad experimentalmente derivados de muchas proteínas y también pudieran ser el resultado de la contaminación con sales o agua. El modelo predictivo encuentra aplicación por su sencillez. Sin embargo, este modelo presenta limitaciones: requiere la presencia de residuos de Trp, Tyr y Cys, así como el conocimiento del número de estos residuos en la secuencia de la proteína y supone implícitamente que las características de absorptividad de Trp, Tyr y Cys determinadas para el modelo son equivalentes en otras condiciones experimentales.

Por el contrario, el análisis de aminoácidos provee una medida absoluta de los aminoácidos libre de interferencias. Anders y colaboradores³ demostraron que la determinación de as mediante la cuantificación de los aminoácidos con comportamiento estable durante la hidrólisis ácida es precisa. Ellos obtuvieron para la BSA un valor de as que difiere del valor obtenido en nuestro trabajo en un 2%. Esta diferencia está dentro del rango de error probable entre diferentes laboratorios para esta técnica¹⁶.

Los resultados obtenidos demuestran que la metodología implementada en nuestro trabajo con la BSA como proteína modelo y que emplea la técnica de análisis de aminoácidos para la determinación de la concentración de proteínas permite determinar el coeficiente de absorptividad específico con precisión y nos permite el empleo de la metodología para la determinación de esa constante físico-química para otras proteínas de interés biofarmacéutico.

Factor de crecimiento epidérmico humano recombinante

Stanley Cohen en 1962 aisló por primera vez el factor de crecimiento epidérmico (EGF), una proteína con 53 residuos aminocídicos, a partir de las glándulas submaxilares de ratón macho adulto²³. Esta proteína es un factor de crecimiento y sus principales propiedades físico-químicas han sido determinadas²⁷. Su efecto biológico consiste en la modulación de la proliferación celular por medio de la activación del receptor tirosina quinasa del EGF y la proteína quinasa C. El EGF posee un gran potencial en la aplicación clínica, especialmente en la reparación de las heridas corneales después de la cirugía, así como en el tratamiento de quemaduras y úlceras²⁷.

Existen informes en la literatura del coeficiente de absorptividad del EGF. Se informa un valor de $3.09 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el EGF aislado de las glándulas submaxilares de ratón macho adulto²³ y de $3.025 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el EGF humano²⁴, ambos con 53 aminoácidos en su estructura. La secuencia de esta proteína en ambas especies no es idéntica, pero si lo es el contenido de aminoácidos con cadenas laterales aromáticas. La molécula objeto de nuestro estudio es una preparación heterogénea compuesta por dos especies proteicas de 51 y 52 aminoácidos, que se obtienen además en proporciones variables entre los lotes de producción. Aun cuando la diferencia entre estas especies consiste en un residuo de leucina²⁷ aminoácido que no aporta significativamente a las características espectrofotométricas de las proteínas, la determinación experimental del coeficiente de absorptividad es indispensable para demostrar la existencia de un único valor de coeficiente de absorptividad específico en esta molécula y utilizar este valor para la determinación de la concentración total de proteínas de los lotes. Por otra parte, la determinación experimental del coefi-

coeficiente de absorptividad específico es un requisito exigido por las agencias reguladoras para la caracterización de los productos biofarmacéuticos de uso en humanos¹.

Como resultado del proceso de purificación mediante cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa de la preparación de EGFhr se obtuvieron dos picos mayoritarios. El que eluye a menor tiempo de retención se identificó como EGFhr-51 y a mayor tiempo como EGFhr-52²⁷. Las fracciones obtenidas se liofilizaron. Las preparaciones puras de ambas proteínas se disolvieron en agua libre de aminoácidos. A partir de estas soluciones y considerando la concentración estimada por BCA se preparó las soluciones seriadas de trabajo. A cada solución de trabajo a diferentes concentraciones se le determinó la concentración de proteínas mediante la técnica de análisis de aminoácidos, en experimentos ejecutados en días diferentes. En los dos experimentos se registró la absorbancia de las soluciones de trabajo de las especies EGFhr-51 y EGFhr-52 en el rango entre 200 y 400 nm. La absorbancia de las muestras fue leída contra el blanco y no fue necesario hacer correcciones a 330 nm para restar el efecto de la dispersión de la luz²⁸. El máximo de absorbancia se registró a 280 nm. Un factor importante al momento de preparar las diluciones seriadas fue que las lecturas de absorbancia a la longitud de onda seleccionada para la determinación del coeficiente de absorptividad quedaran dentro del rango de linealidad del espectrofotómetro empleado. En la composición aminoacídica del EGFhr están presentes varios residuos que contribuyen considerablemente a su absorbancia a 280 nm. Por esa razón fue necesario hacer diluciones de las soluciones de trabajo. Los valores obtenidos se corrigieron por el factor de dilución.

El coeficiente de absorptividad específico se determinó como la pendiente de la recta de regresión lineal de los valores de absorbancia a 280 nm en función de la concentración de las soluciones, obtenida experimentalmente. El valor de la pendiente, la desviación estándar, el coeficiente de correlación y los límites de confianza determinados para ambas especies en cada experimento se muestran en la tabla 4. En todos los casos, el coeficiente de determinación, numéricamente igual al cuadrado del coeficiente de correlación, fue superior a 0.97, lo que demuestra la calidad del ajuste lineal. Los valores de los coeficientes de variación de la pendiente demuestran la precisión de su determinación.

En la tabla 5 se muestran los resultados de las pendientes combinadas de las 2 réplicas de cada día y de los 2 días para las 2 especies moleculares estudiadas. Los altos valores de probabilidad obtenidos, mucho mayores que 0.05, demuestran que no existen diferencias significativas entre las pendientes estudiadas, lo que evidencia la consistencia de los resultados

de los análisis. La diferencia entre este resultado y el obtenido para la BSA, donde si se observaron diferencias significativas, son debido a la ligera disminución de la precisión en la estimación de las réplicas para el EGFhr. Por otra parte, la homogeneidad de los resultados obtenida para el EGFhr redundan en un aumento de la precisión de las pendientes combinadas, de forma tal que los coeficientes de variación para el EGFhr-51 y EGFhr-52 son muy similares a los obtenidos para la pendiente combinada de la BSA.

La tabla 6 presenta el promedio entre los resultados obtenidos para ambas especies moleculares. El valor de probabilidad de que las diferencias observadas entre el valor obtenido para el EGFhr-51 y el EGFhr-52 fueran debidas al azar resultó igual a la unidad. La prueba de significación de la diferencia entre las pendientes se convierte en un instrumento para determinar si los coeficientes de absorptividad de ambas especies moleculares son iguales. En este caso por tratarse de especies diferentes, se compara el incremento de la varianza residual contra la varianza residual debida a la variabilidad entre ensayos. El valor obtenido demuestra que no existen diferencias prácticas entre los valores de los coeficientes de absorptividad específico de las 2 especies moleculares en estudio del EGFhr.

Conclusiones

El coeficiente de absorptividad específico del EGFhr que contiene dos especies proteicas de 51 y 52 aminoácidos, determinado mediante el uso de la técnica de análisis de aminoácidos para la cuantificación de proteína, es 3.1125 mL mg⁻¹ cm⁻¹, con límites del intervalo de confianza al 95 % desde 3.0340 mL mg⁻¹ cm⁻¹ hasta 3.1911 mL mg⁻¹ cm⁻¹. El coeficiente de variación obtenido para el coeficiente de absorptividad fue de 1.22%. La prueba de significación de la diferencia entre las pendientes demuestra que no existen diferencias entre los valores de los coeficientes de absorptividad específico de las 2 especies moleculares en estudio del EGFhr y se justifica completamente el empleo de un coeficiente de absorptividad común.

Agradecimientos

Parte de este trabajo fue apoyado por la Fundación Alexander von Humbolt (Alemania). La autora agradece al Dr. Gerardo García Illera su contribución en la evaluación estadística de los resultados.

Muestra	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3
C teórica (mg/mL)	2.0	2.0	2.0
C experimental (mg/mL)	1.95	1.88	2.21
C promedio (mg/mL)		2.02	
DE		0.18	
CV (%)		8.87	
Error (%)		0.83	

C - concentración. DE – desviación estándar. CV (%) – coeficiente de variación porcentual. Error (%) = ((VE-VT)/VT) *100, donde VE es el valor experimental y VT el valor teórico de la concentración de la proteína.

Tabla 1. Control de la cuantificación por análisis de aminoácidos. Determinación de la concentración de proteína de la preparación comercial de BSA mediante la técnica de análisis de aminoácidos..

Experimento	Réplica			Ensayo		Media general	
	Pendiente (a _s)	Límite Inferior (a _s)	Límite Superior (a _s)	Pendiente Límite Superior Límite Inferior (a _s)	¿Diferencias significativas?	Pendiente Límite Superior Límite Inferior (a _s)	¿Diferencias significativas?
Día 1	0.6785	0.6674	0.6897	0.6789	No	0.6758	Si
	0.6791	0.6412	0.7170	0.6726			
	0.6816	0.6514	0.7119	0.6853			
Día 2	0.6895	0.6597	0.7193	0.6844	No	0.6689	
	0.6826	0.6670	0.6982	0.6762			
	0.6861	0.6532	0.7191	0.6926			
Día 3	0.6503	0.6104	0.6902	0.6565	Si	0.6827	
	0.6471	0.6366	0.6576	0.6457			
	0.6711	0.6549	0.6873	0.6673			

a_s – coeficiente de absorptividad específico (mL mg-1 cm-1).

Tabla 2. Determinación del coeficiente de absorptividad específico de la BSA (a_s). Resultados del cálculo de la pendiente para cada réplica, para cada ensayo y la media general de los 3 experimentos realizados.

Experimento	CV intra réplica (%)	CV combinado intra réplica para cada ensayo (%)	CV combinado intra réplica General (%)	CV entre réplicas (%)	CV combinado entre réplicas (%)	CV entre ensayos (%)
Día 1	0.5164	1.2212	1.1606	0.2425	0.9093	1.2682
	1.7534					
	1.3938					
Día 2	1.3571	1.1950		0.5009		
	0.7185					
	1.5093					
Día 3	1.9287	1.0656		1.9844		
	0.5090					
	0.7591					

CV – coeficiente de variación (%).

Tabla 3. Indicadores estadísticos de la calidad de la regresión. Coeficiente de variación intra réplicas, entre réplicas y entre ensayos.

Especie EGFhr-51				
	Día 1 réplica 1	Día 1 réplica 2	Día 2 réplica 1	Día 2 réplica 2
Pendiente	2.9380	3.0953	3.2118	3.2376
DE	0.0621	0.0786	0.0533	0.1191
CV (%)	2.1137	2.5393	1.6595	3.6787
r²	0.9932	0.9902	0.9957	0.9827
Límite Inferior	2.7405	2.8452	3.0423	2.8586
Límite Superior	3.1355	3.3455	3.3813	3.6166
Especie EGFhr-52				
	Día 1 réplica 1	Día 1 réplica 2	Día 2 réplica 1	Día 2 réplica 2
Pendiente	2.8553	3.1292	3.2459	3.2413
DE	0.0518	0.1022	0.1481	0.1043
CV (%)	1.8142	3.2660	4.5627	3.2178
r²	0.9949	0.9827	0.9710	0.9853
Límite Inferior	2.6905	2.8040	2.7747	2.9094
Límite Superior	3.0201	3.4543	3.7171	3.5731

Tabla 4. Determinación del coeficiente de absorptividad específico de las especies EGFhr-51 y EGFhr-52. Valores de la pendiente de la regresión lineal, desviación estándar (DE), coeficiente de variación, (CV), coeficiente de correlación (r²) y límites de confianza obtenidos empleando el valor de concentración de las soluciones de trabajo determinado experimentalmente mediante la técnica de análisis de aminoácidos y el valor de absorbancia a 280 nm.

Tabla 5. Determinación del coeficiente de absorptividad específico de las especies EGFr-51 y EGFr-52. Valores de la pendiente de la regresión lineal, desviación estándar (DE), coeficiente de variación, (CV), coeficiente de correlación (r^2) y límites de confianza obtenidos empleando el valor de concentración de las soluciones de trabajo determinado experimentalmente mediante la técnica de análisis de aminoácidos y el valor de absorbancia a 280 nm.

Parámetros	EGFr-51		EGFr-52	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
Probabilidad	0.6617	1.0000	0.4327	1.0000
Pendiente	3.0145	3.2256	2.9820	3.2436
DE	0.0549	0.0620	0.0732	0.0836
CV (%)	1.8212	1.9221	2.4547	2.5774
r^2	0.9882	0.9880	0.9779	0.9782
Límite Inferior	2.8845	3.0790	2.8090	3.0460
Límite Superior	3.1444	3.3723	3.1550	3.4411
Media EGFr-51 y EGFr-52				
Probabilidad	0.5663		0.6015	
Pendiente	3.1138		3.1109	
DE	0.0483		0.0633	
CV (%)	1.5512		2.0348	
r^2	0.9825		0.9694	
Límite Inferior	3.0109		2.9759	
Límite Superior	3.2167		3.2459	

Parámetros	Media EGFr-51 y EGFr-52
Probabilidad	1.0000
Pendiente	3.1125
DE	0.0385
r^2	0.9772
Límite Inferior	3.0340
Límite Superior	3.1911

Tabla 6. Resultados de la combinación de pendientes del EGFr-51 y el EGFr-52. Junto a la pendiente se muestra la probabilidad de que las diferencias entre las dos pendientes promediadas sean obtenidas por azar, la desviación estándar de la pendiente combinada (DE), el coeficiente de determinación (r^2) y los límites de confianza.

Referencias bibliográficas

- Guidance for Industry. Q6B Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. August 1999. ICH. Página 18.
- Benson, A.M.; Suruda, A.J. y Talalay, P. (1975) Concentration-dependent association of Δ^3 -ketosteroid isomerase of *Pseudomonas testosteroni*. *J Biol Chem* 250: 276-280.
- Anders, J.C.; Parten, B.F.; Petrie, G.E.; Marlowe, R.L. y McEntire, J.E. (2003) Using Amino Acid Analysis to Determine Absorptivity Constants. A validation case study using Bovine Serum Albumin. *BioPharma* 17, 30-37.
- Jaenicke, L. (1974) A rapid micromethod for the determination of nitrogen and phosphate in biological material. *Anal Biochem* 61: 623-627.
- Hunter, M.J. (1966) A method for the determination of protein partial specific volumes. *J Phys Chem* 70: 3285-3292.
- Kupke, D.W. y Dorrier, T.E. (1978) Protein concentration measurements: the dry weight. *Methods Enzymol* 48: 155-162.
- Nozaki, Y. (1986) Determination of the concentration of protein by dry weight: a comparison with spectrophotometric methods. *Arch Biochem Biophys* 249: 437-446.
- Edelhoc, H. (1967) Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins. *Biochemistry* 6: 1948-1954.
- Bradford, M.M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. y Randall, R.L. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.
- Wilkins, M.R.; Gasteiger, E.; Bairoch, A.; Sanchez, J.-C.; Williams, K.L.; Appel, R.D. y Hochstrasser, D.F. (1998) Protein Identification and Analysis Tools in the EXPASY Server En: 2-D Proteome Analysis Protocols. Editor: A.J. Link. Editorial: Humana Press Inc, New Jersey.
- McEntire, J. (1994) Selection and validation of analytical techniques. *BioPharm* 7, 68-80.
- Sandford Bolton (1997). "Pharmaceutical Statistics. Practical and Clinical Applications". Editorial: Marcel Dekker, Inc. Tercera edición, 315-320.
- Combination of Independent Assays. The United States Pharmacopeia-NF 26. The National Formulary. 2008. Volume 1:117-118.
- Steel, R. G. D. y Torrie, J. H. (1988). "Bioestadística: Principios y Procedimientos", Editorial: McGRAW-HILL, 2da edición, 250-252.
- Reason, A. J. (2003) Validation of Amino Acid Analysis Methods. En: *Methods in Molecular Biology. Protein Sequencing Protocols* vol 211, 181-194. Editor: B.J. Smith. Editorial: Humana Press Inc, New Jersey.
- Penke, B.; Ferenczi, R. y Kovacs, K. (1974) A new acid hydrolysis method for determining Tryptophan in peptides and proteins. *Anal Biochem* 60: 45-50.
- Spencer, R.L. y Wold, F. (1969) A new convenient method for estimation of total cystine-cysteine in proteins. *Anal Biochem* 32: 185-190.
- Wetlaufer, D.B. (1962) Ultraviolet Spectra of Proteins and Amino Acids. *Adv Protein Chem* 17: 303-391.
- Gill, S.C. y von Hippel, P.H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182: 319-326.

21. Pace, C. N.; Vajdos, F.; Fee, L.; Grimsley, G. y Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* 4: 2411-2423.
22. Nozaki, Y. (1986) Determination of the concentration of protein by dry weight: a comparison with spectrophotometric methods. *Arch Biochem Biophys* 249: 437-446.
23. Cohen, S. (1962) Isolation of a Mouse Submaxillary Gland Protein Accelerating Incisor Eruption and Eyelid Opening in the New-born Animal. *J Biol Chem* 237: 1555-1562.
24. Taylor, J.M.; Mitchell, W.M. y Cohen, S. (1972) Epidermal Growth Factor. Physical and Chemical Properties. *J Biol Chem* 247: 5928-5934.
25. Carpenter, G. y Cohen, S. (1990) Epidermal Growth Factor. *J Biol Chem* 265: 7709-7712.
26. Certificado de producto. Promega Corporation. 2800 Woods Hollow Road. Madison, WI 53711-5399, EEUU.
27. Besada, V.; Antuch, W.; Cinza, A.M.; Rojas, I.; Quintana, M. Y Padrón, G. (1990) Chemical characterization of recombinant epidermal growth factor. *Anal Chim Acta* 239: 301-305.
28. Leach, S.J. y Scheraga, H.A. (1960) Effect of Light Scattering on Ultraviolet Difference Spectra. *J Am Chem Soc* 82: 4790-4792.

Recibido: 10 septiembre 2018

Aprobado: 1 noviembre 2018