DETECCIÓN DE PROTEÍNAS DE CÉLULAS HUÉSPED (HCP) EN MEDICAMENTOS BIOLÓGICOS: ESTRATEGIAS DE LC-MS/MS PARA LA ELIMINACIÓN DE HCP Y EL CUMPLIMIENTO NORMATIVO

Todo biofármaco producido en un sistema de células vivas conlleva una carga inevitable: las proteínas expresadas por la propia célula huésped. Estas impurezas, derivadas del proceso de producción, están presentes en los productos biológicos desde las primeras etapas de la fermentación y deben caracterizarse, controlarse y eliminarse sistemáticamente antes de que un producto pueda considerarse seguro para su administración en humanos.

AMS BIOPHARMA.

La gestión de las proteínas de la célula huésped en el desarrollo de productos biológicos es uno de los retos más exigentes desde el punto de vista analítico y con mayores repercusiones regulatorias en la fabricación de biofármacos. Los métodos elegidos para detectar y controlar estas proteínas determinan toda la estrategia posterior, influyen en las solicitudes de aprobación regulatoria y, en última instancia, definen qué llega al paciente.

¿Qué son las proteínas de la célula huésped y por qué son un atributo de calidad fundamental en los productos biológicos?

Las proteínas de la célula huésped (HCP, por sus siglas en inglés) son proteínas endógenas expresadas por la línea celular de producción (generalmente células de ovario de hámster chino (CHO)) que coexisten con la proteína terapéutica recombinante durante la fermentación y se liberan al medio de cultivo mediante secreción celular normal o lisis celular a medida que la viabilidad disminuye hacia el final del proceso de producción. Las impurezas de HCP pueden ser miles de especies distintas, con una amplia variación en su abundancia con respecto al fármaco.

La relevancia de las proteínas de la célula huésped (HCP, por sus siglas en inglés) como atributo crítico de calidad se deriva de dos categorías de riesgo distintas. En primer lugar, las HCP específicas tienen efectos directos sobre la calidad del producto: las enzimas proteolíticas pueden degradar la proteína terapéutica durante su vida útil, las lipasas pueden desestabilizar las formulaciones lipídicas y las proteínas acompañantes abundantes pueden copurificarse con el fármaco mediante pasos basados en la afinidad, asociándose estrechamente con el propio anticuerpo. En segundo lugar, la inmunogenicidad de las proteínas de la célula huésped representa una preocupación para la seguridad del paciente: las HCP residuales que llegan al producto final pueden desencadenar respuestas inmunitarias, generando potencialmente anticuerpos contra el fármaco o provocando efectos clínicos adversos, especialmente en pacientes que reciben dosis repetidas.

Dado que el perfil de HCP de un bioproceso no se puede predecir a partir de principios básicos y es sensible a la línea celular, la composición del medio, la duración del cultivo, la escala y los

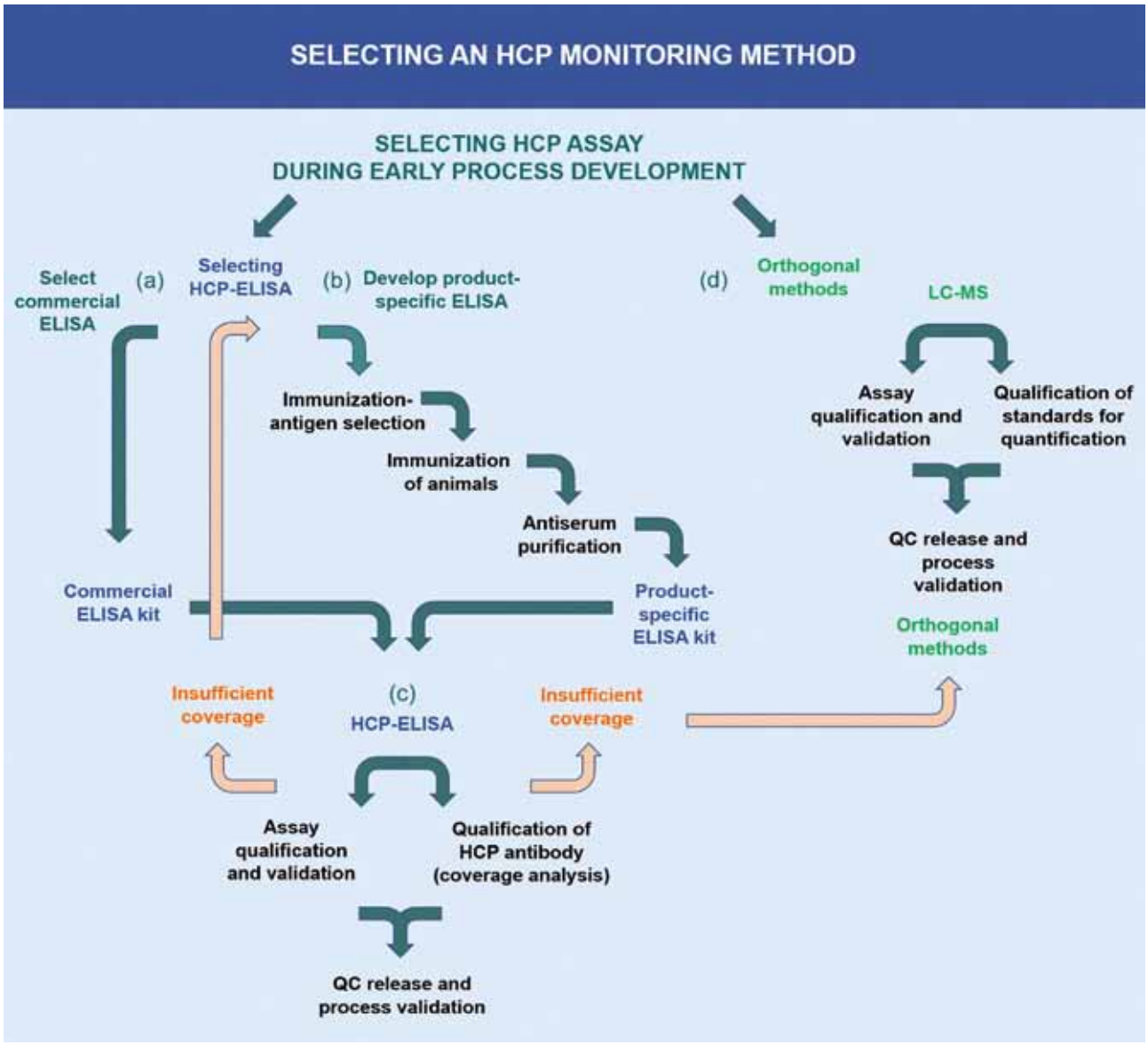

Figura 1. Selecting an HCP monitoring method. Source: Pilely K, Johansen MR, Lund RR, Kofoed T, Jørgensen TK, Skriver L, Mørtz E. Monitoring process-related impurities in biologics-host cell protein analysis. Anal Bioanal Chem. 2022 Jan;414(2):747-758.

cambios en el proceso, el monitoreo debe comenzar en la cosecha y continuar en cada etapa posterior. Por ello, el monitoreo de HCP en la fabricación de biofármacos se clasifica como un atributo crítico de calidad en las directrices regulatorias y no simplemente como un ejercicio de caracterización.

Métodos de detección de HCP: cuando ELISA se queda corto y LC-MS/MS toma el relevo

El ELISA para proteínas de células huésped sigue siendo valioso para el monitoreo rutinario de procesos, pero sus limitaciones son estructurales. Dado que la detección depende del reconocimiento de anticuerpos policlonales, el ensayo de proteínas de células huésped solo detecta las proteínas de células huésped que provocan una respuesta inmunogénica durante la generación de anticuerpos. Las proteínas de bajo peso molecular y las especies débilmente inmunogénicas pueden pasar completamente desapercibidas, y el ELISA no proporciona información sobre la identidad o la abundancia individual de especies específicas de proteínas de células huésped.

Aquí es donde la detección de proteínas de células huésped mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) aporta un valor complementario. La comparación entre ELISA y LC-MS/MS para proteínas de células huésped no se centra en qué método es superior, sino en cómo se complementan entre sí.

- ELISA proporciona una monitorización rápida y de alta sensibilidad de las proteínas de la célula huésped (PCH) para la toma de decisiones rutinarias en la liberación de productos.
- LC-MS/MS proporciona la identidad a nivel molecular y la abundancia relativa de cada especie detectada.

- LC-MS/MS identifica las PCH que ELISA no detecta, incluidas las especies débilmente inmunogénicas y de bajo peso molecular.
- El análisis de cobertura ELISA-MS, que combina la inmunocaptura con la lectura por espectrometría de masas, permite evaluar directamente cuántas PCH en una muestra de proceso son detectadas por un anticuerpo ELISA determinado, generando datos que se pueden expresar como porcentajes de cobertura de proteínas individuales.

Para programas donde especies específicas de PCH representan riesgos para la estabilidad o la seguridad, la espectrometría de masas de impurezas biofarmacéuticas es el único método analítico capaz de generar la evidencia necesaria para tomar medidas al respecto.

Estrategias de eliminación de HCP en las etapas posteriores del bioprocesamiento

La eliminación de HCP en la purificación biológica se produce progresivamente a través de múltiples operaciones unitarias, y los datos de LC-MS/MS son idóneos para optimizar este proceso. Al generar datos de identidad y cuantificación en cada etapa de purificación, es posible rastrear los HCP individuales a lo largo de la cadena de producción, identificar qué etapas proporcionan la mayor eliminación para cada especie y priorizar las modificaciones del proceso en función de la identidad de las impurezas persistentes, en lugar de basarse únicamente en los valores totales de ELISA.

Las estrategias de eliminación de HCP en el procesamiento posterior se guían por las propiedades fisicoquímicas (peso molecular, punto isoeléctrico, hidrofobicidad y asociación con el producto) de los HCP específicos que sobreviven a la purificación inicial. La optimización basada en datos, utilizando perfiles de HCP derivados de LC-MS/MS, puede orientar los ajustes específicos:

- La cromatografía de intercambio iónico, el pH y las condiciones de fuerza iónica pueden ajustarse para aprovechar las diferencias de carga entre las proteínas de la célula huésped persistentes y el fármaco. Este ajuste solo es posible cuando se identifican las especies específicas y se dispone de los datos del punto isoeléctrico.
- Los pasos de exclusión por tamaño pueden ajustarse en función de la distribución del peso molecular de las especies copurificadas, utilizando la identidad a nivel de proteína y la información de masa.
- Las proteínas de la célula huésped que se asocian estrechamente a la proteína del fármaco (denominadas proteínas de la célula huésped "acompañantes") son particularmente difíciles de eliminar. La identificación de estas especies en las distintas etapas de purificación permite reconocer el problema y rediseñar las operaciones unitarias afectadas.
- En los casos en que las proteínas de la célula huésped específicas sean estructuralmente similares a la proteína del fármaco y resistan la eliminación, los datos de identidad derivados de LC-MS/MS pueden respaldar la decisión de implementar estrategias de inactivación génica en la línea celular huésped.

La combinación de ELISA para el monitoreo de la consistencia del proceso y LC-MS/MS para la eliminación de HCP a nivel molecular en la evaluación de productos biológicos se ha aplicado en solicitudes de licencia regulatoria, proporcionando el nivel de comprensión del proceso que requieren los marcos regulatorios modernos.

Expectativas regulatorias para el monitoreo de profesionales de la salud: FDA, EMA y USP <1132>

La supervisión regulatoria de la FDA y la EMA sobre los HCP no establece límites numéricos fijos para los HCP residuales en el producto final. En cambio, ambas agencias exigen a los fabricantes que demuestren que el monitoreo de HCP en la fabricación biofarmacéutica se basa en métodos analíticos adecuados y que los niveles de impurezas se reducen hasta un nivel compatible con la calidad del producto y la seguridad del paciente. El riesgo asociado a los HCP residuales depende del contexto clínico: dosis, vía de administración, población de pacientes y la identidad y propiedades funcionales de las impurezas específicas presentes.

La USP <1132> sobre proteínas de células huésped (el capítulo de la Farmacopea de los Estados Unidos sobre la medición de HCP residuales en biofármacos) reconoce explícitamente la LC-MS como complementaria a la ELISA para la caracterización de HCP. La evaluación del riesgo de HCP en productos biológicos, según las expectativas actuales, integra la persistencia a través de la purificación, la actividad funcional, la exposición del paciente y los mecanismos de asociación del producto, evidencia que una estrategia combinada de detección de HCP mediante ELISA y LC-MS/MS está diseñada específicamente para generar.

En AMSbiopharma, apoyamos el análisis de proteínas de células huésped en todas las etapas del desarrollo biofarmacéutico, desde la caracterización inicial de HCP hasta la caracterización del proceso de purificación y el apoyo para la presentación regulatoria, utilizando plataformas avanzadas de UHPLC-MS/MS con flujos de trabajo de adquisición DIA.

Referencias

- Pilely K, Johansen MR, Lund RR, Kofoed T, Jørgensen TK, Skriver L, Mørtz E. Monitoring process-related impurities in biologics-host cell protein analysis. Anal Bioanal Chem. 2022 Jan;414(2):747-758. doi: 10.1007/s00216-021-03648-2.
- Seidel JD, Condina MR, Klingler-Hoffmann M, Young C, Donnellan L, Kyngdon C, Hoffmann P. Development of an Optimized LC-MS Workflow for Host Cell Protein Characterization to Support Upstream Process Development. J Proteome Res. 2025 Jan 3;24(1):234-243. doi: 10.1021/acs.jproteome.4c00637.
- Tank P, D'Souza F, Kayalvizhi N, Rameshkumar N. Redefining biologics safety through advanced analytics: MS-based host cell protein profiling. Trends Biotechnol. 2026. doi: 10.1016/j.tibtech.2026.05.011.