

Universitat Pompeu Fabra
Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud

Tesis Doctoral

**Validación y caracterización de un método
inmuno-electroforético para la detección de
eritropoyetina recombinante y análogos.**

Viviana Belalcazar Guerrero

Barcelona, 2007

Universidad Pompeu Fabra

Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud y de la Vida

Validación y caracterización de un método inmuno-electroforético para la detección de eritropoyetina recombinante y análogos.

Memoria presentada por Viviana Belalcazar Guerrero para optar al grado de Doctor por la Universidad Pompeu Fabra. Trabajo realizado bajo la dirección del Doctor José Antonio Pascual, en la Unidad de Farmacología, del Instituto Municipal de Investigaciones Médicas (IMIM). Programa de Doctorado de la Universidad Pompeu Fabra, bienio 1998-2000.

Firma del director de tesis
Dr. José Antonio Pascual

Firma del doctorando
Viviana Belalcazar Guerrero

A mis motores, “mi familia”; “Carlos” y mi cachorrito, “Laia”.

*“...mas allá del mar habrá un lugar donde el sol
Cada mañana brille más
Forjará mi destino las piedras del camino
Lo que nos es querido siempre queda atrás ...”
Un beso y una flor.....”
por Nino Bravo.*

INDICE

INDICE	VII
ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	XI
AGRADECIMIENTOS	XVII
MOTIVACIÓN PERSONAL	XXIII
CAPÍTULO 1	2
ERITROPOYETINA (EPO)	2
<i>ASPECTOS HISTORICOS DE LA EPO</i>	2
<i>PROPIEDADES QUIMICAS DE LA EPO</i>	4
<i>CADENAS DE AZÚCARES</i>	5
Estructura y función general	5
Estructura de los azúcares presentes en la uEPO.....	8
<i>SITIOS DE PRODUCCIÓN DE LA EPO</i>	10
TABLA 1: SITIOS DE PRODUCCIÓN DE EPO Y SU RECEPTOR EN HUMANOS	11
<i>MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EPO</i>	12
TABLA 2: CAUSAS Y CONDICIONES EN DONDE SE PUEDE OBSERVAR HIPOXIA	12
<i>MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA EPO</i>	15
Eritropoyesis	15
Receptor de la EPO: mecanismos de señalización y transducción.....	18
Otros mecanismos de acción no hematopoyéticos	21
Acción neuroprotectora	21
Acción angiogénica	22
<i>METABOLISMO</i>	23
<i>CONCENTRACIONES DE EPO</i>	26
Concentraciones de EPO bajo condiciones fisiológicas.....	28
Concentraciones de EPO bajo condiciones patológicas	29
CAPÍTULO 2	32
ERITROPOYETINA RECOMBINANTE	32
<i>PROPIEDADES QUIMICAS DE LA EPO RECOMBINANTE</i>	33
TABLA 5: PROPIEDADES QUÍMICAS DE REPO ALFA, BETA, OMEGA Y NESP	34
<i>Cadenas de azúcares: rEPO</i>	35
<i>UTILIZACION TERAPEUTICA</i>	37
<i>FARMACOCINÉTICA</i>	38
Rutas de administración.....	39

Vía Intravenosa.....	39
Vía Subcutánea	40
Vía Intraperitoneal.....	41
CAPÍTULO 3	44
ERITROPOYETINA RECOMBIANTE EN EL DEPORTE	44
<i>ANTECEDENTES HISTORICOS: ERITROPOYESIS VS DOPAJE.....</i>	44
<i>DOPAJE Y ORGANISMOS REGULADORES.....</i>	48
Agencia Mundial Antidopaje (AMA).....	49
Código Mundial Antidopaje.....	50
Estándares internacionales.....	50
Tipos de estándares internacionales aprobados por la AMA	50
CAPÍTULO 4	56
RECOMBINANT ERYTHROPOIETIN AND ANALOGUES. A CHALLENGE FOR DOPING	
CONTROL	56
<i>MARKERS OF RECOMBINANT EPO ABUSE.....</i>	56
<i>INDIRECT MARKERS.....</i>	57
<i>DIRECT DETECTION</i>	57
<i>ANALOGUES</i>	58
<i>MIMETICS.....</i>	58
<i>GENE THERAPY.....</i>	59
CAPÍTULO 5	62
OBJETIVOS	62
CAPÍTULO 6	64
MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
<i>VALIDACIÓN.....</i>	64
Materiales y reactivos	64
Material de referencia	64
Procedimiento normalizado de trabajo.....	64
Protocolo de validación.....	66
Protocolo de validación intra-laboratorio.....	66
Protocolo de validación inter-laboratorio.....	67
Evaluación de las variables que afectan el metodo de IEF.....	67
<i>ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS CARGAS RESPONSABLES DE LOS PERFILES</i>	
<i>DE IEF.....</i>	68
CAPÍTULO 7	70
RESULTADOS.....	70

<i>PROJECT FOR INTER-LABORATORY COMPARISON OF THE METHOD FOR THE DETECTION OF RHEPO IN HUMAN URINE. RESULTS, CONCLUSIONS AND CURRENT STATUS.....</i>	<i>72</i>
<i>VARIABLES AFFECTING EPO DETECTION BY ISOELECTRIC FOCUSING IN HUMAN URINE SAMPLES.</i>	<i>84</i>
<i>ANTI-EPO AND ANTI-NESP ANTIBODIES RAISED AGAINST SYNTHETIC PEPTIDES THAT REPRODUCE THE MINIMAL AMINO ACID SEQUENCE DIFFERENCES BETWEEN EPO AND NESP.....</i>	<i>110</i>
<i>ASSESSING THE INSTABILITY OF THE ISOELECTRIC FOCUSING PATTERNS OF ERYTHROPOIETIN IN URINE.....</i>	<i>118</i>
CAPÍTULO 8	128
DISCUSIÓN.....	128
<i>ESTUDIO 1.....</i>	<i>128</i>
<i>ESTUDIO 2 Y 3.....</i>	<i>136</i>
<i>ESTUDIO 4.....</i>	<i>140</i>
CAPÍTULO 9	144
CONCLUSIONES.....	144
<i>ESTUDIO 1.....</i>	<i>144</i>
<i>ESTUDIO 2 Y 3.....</i>	<i>145</i>
<i>ESTUDIO 4.....</i>	<i>145</i>
CAPÍTULO 10	148
BIBLIOGRAFIA.....	148
CAPÍTULO 11	164
ANEXOS.....	164
<i>ANEXO 1. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO PARA LA DETERMINACION DE ERITROPOYETINA RECOMBINANTE Y SUSTANCIAS ANALOGAS EN ORINA HUMANA MEDIANTE ISOELECTROENFOQUE, DOBLE TRANSFERENCIA Y DETECCION POR QUIMIOLUMINISCENCIA.....</i>	<i>165</i>
<i>ANEXO 2. PROCEDIMIENTO DE EVALUACIÓN.....</i>	<i>173</i>
<i>ANEXO 3. POSTER: POTENTIAL ISOFORM DISCRIMINATION DURING IMMUNOAFFINITY PURIFICATION OF EPOETIN AND DARBEPOETIN.</i>	<i>175</i>
<i>ANEXO 4. POSTER: STABILITY OF EPO IN URINE</i>	<i>177</i>

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMA	Agencia Mundial antidopaje
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Asn	Asparagina
BFU-E	Unidad formadora de colonias eritroides grandes primitivos; sigla en inglés de Burst-Forming Unit Erythroid
BHK	Riñón de crías de Hamster, Sigla en inglés de Baby Hamster Kidney
BPL	Buenas prácticas del laboratorio
Ca²⁺	Calcio
CCD	Dispositivo de cargas (eléctricas) interconectadas, sigla en inglés de Charge-Coupled Device.
CERA	Activador continuo del receptor de la EPO, sigla en inglés de Continuous Erythropoietin Receptor Activator
CFU	Células o unidades formadoras de colonia, sigla en inglés de Colony Formation Unit
CFU-E	Unidad formadora de colonias eritroides pequeñas; sigla en inglés de Colony-Forming Unit Erythroid
CFU-L	Célula germinal linfóide; sigla en inglés de Colony Formation Unit-Lymphoid
CFU-LM	Célula madre linfomieloide; sigla en inglés de Colony Formation Unit-LymphoMyeloid
CFU-M	Célula germinal mieloide; sigla en inglés de Colony Formation Unit-Myeloid)
CHO	Células de ovario de hámster de origen chino; sigla en inglés de Chinese Hamster Ovary
CO	Monóxido de carbono
Co²⁺	Cobalto
COI	Comité Olímpico Internacional
Da	Dalton
dl	Decilitro

Dynepo	Epoetin delta
ELISA	Ensayo inmunoenzimático; sigla en inglés de Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.
ENAC	Entidad Nacional de Acreditación
EPO	Eritropoyetina
EURACHEM	Asociación europea de química analítica, sigla en inglés de European Analytical Chemistry
FDA	Agencia americana de alimentos y medicamentos, sigla en inglés de Food and Drug Administration
Fe	Hierro
FIS	Federación internacional de esquí; sigla en francés de Fédération Internationale de Ski.
Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetil-D-galactosamina
GATA-1	Factor de transcripción GATA1, sigla en inglés de GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)
Glc	Glucosa
GlcNAc	N-acetil-D-glucosamina
GLP	Buenas prácticas de laboratorio, sigla en inglés de Good Laboratory Practices
GM-CSF	Factor estimulante de Colonia de Granulocitos y Macrófagos; sigla en inglés de Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
Hb	Hemoglobina
HCP	Proteína tirosina fosfatasa, de tipo no receptor; sigla en inglés, protein tyrosine phosphatase, non-receptor type.
Hcto	Hematocrito
HIF-1	Factor inducible por hipoxia, sigla en inglés de Hypoxia-Inducible factor-1
HRE	Elemento de respuesta a la hipoxia, sigla en inglés de Hypoxic Response Element
IAC	Columnas de inmunoafinidad, sigla en inglés de immunoaffinity column

IAAF	Federación Internacional de Atletismo; sigla en inglés de International Association of Athletics Federations
ICH	Sigla en inglés de International Conference on Harmonization
IEF	Isoelectroenfoque
IGF-1	Factor de crecimiento 1 similar a la insulina; sigla en inglés de Insulin-Like Growth Factor-1
IL-1	Interleucina 1
INNs	Sigla en inglés de International Nonproprietary Names
IU	Unidades internacionales; sigla en inglés de International Unit
JAK2	Proteína tirosinquinasa de la familia Janus 2; sigla en inglés de Janus kinase 2 [a protein tyrosine kinase]
L-NMMA	N-monometil-arginina
LOD	Límite de detección, sigla en inglés de Limit of detection.
Man	Manosa
NARL	National Analytical Reference Laboratory of Australia
NESP	Sigla en inglés de Novel Erythropoiesis Stimulating Protein
Neu5,9Ac2	Ácido 5-N-acetil-9-O- neuramínico
Neu5Ac	Ácido siálico
Neu5Gc	Ácido 5-N-glicolilneuramínico
NFκB	Factor nuclear kappa B
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
O₂	Oxígeno
OMS	Organización mundial de la salud
PaO₂	Presión parcial de oxígeno
pI	Punto isoeléctrico
PI-3K/Akt	Fosfatidil inositol quinasa 3 MAP quinasas
pM	Picomoles
PNGase F	Péptido-N4-(acetil-β-glucosaminil)-asparagina amidasa
rEPO	Eritropoyetina humana recombinante
SCF	Factor de células madres; sigla en inglés de Stem Cell Factor
SEP	Sigla en inglés de Synthetic Erythropoiesis Protein
Ser	Serina
SH2	Sigla en inglés de Src Homology 2 domain

SIDA	Síndrome de InmunoDeficiencia Adquirida
STAT5	Señal de traducción y activación del factor de transcripción 5; sigla en inglés de Signal Transducer and Activator of Transcription 5
sTR	Factor soluble de transferrina
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa; sigla en inglés de Tumor Necrosis Factor alpha.
Trp	Triptófano
TUE	Estándar internacional para el Uso de Exención Terapéutico; sigla en inglés de Therapeutic Use Exemptions
UCI	Unión Ciclista Internacional; sigla en francés de Union Cycliste Internationale
uEPO	EPO urinaria humana
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial; sigla en inglés de Vascular Endothelial Growth Factor)
WADA	Sigla en inglés de World Anti-doping Agency

*A ti señor por todo mi mundo,
A mi mami, por inculcarme la exigencia y la paciencia,
A papá por enseñarme a ser fuerte y valiente,
A mi gordo, Alex, por pintar mi mundo con otros colores
A Carlos, por darme el regalo de amar,
A Laia, por ser lo mejor de mi vida.*

AGRADECIMIENTOS

Por fin ha llegado el momento de escribir este capítulo de mi vida. Son tantas las personas que me han brindado su ayuda, en tantos momentos vividos, aquellos que forman parte de este sueño que alcanza su realidad. A todas ellas mil gracias por haber creído en mí, por haberme enseñado a caminar y por haberme dejado volar para llegar a esta meta.

Agradezco a mi madre, ¡vaya mujer me ha dado Dios de madre!, tal vez otros rumbos hubiera vivido sin tus enseñanzas. Sé que no existe ninguna frase para decirte lo mucho que te agradezco. Gracias mami por luchar a lo largo de todos estos años, por gestar mi vida con paciencia a pesar de la impaciencia de la naturaleza. Gracias por corregir mil veces la palabra “forma” en tus piernas y darte cuenta que una vez más volvía a escribir “foma”. Gracias por la paciencia y la fortaleza que has mostrado durante todo este tiempo que no hemos estado juntas, ya 10 años, sé que no ha sido fácil, pero siempre me has demostrado con tu vida que los caminos se deben descubrir con la cabeza y el espíritu, aplicando exigencia y disciplina. He aquí el fruto de tanto esfuerzo. Nadie más que tú lo puede gozar en toda su magnitud.

Agradezco papá, porque sin darte cuenta me has inculcado el valor de la tierra, el trabajo digno y la profesión como dices tú, “papi”. Gracias por respetar mis decisiones, por ayudarme a construir mis alas, por dejarme descubrir el mundo. Gracias por tu ejemplo de vida, gracias por todo aquello que me has dado, en especial tu apoyo. Este paso es parte de tus sueños, así que disfrútalo.

A ti Alex, mi gordito, tantas cosas que juntos hemos descubierto. No sabes cómo tu presencia en mi vida ha aportado otra visión del mundo y me ha enriquecido. Sé que siempre me dices no entiendo nada de lo que haces pero aun así siempre le has dado un valor importante y sobretodo siempre has creído en mí. Gracias por todas las veces que me has impulsado a seguir

adelante con este proyecto. Has vivido con tanta ilusión este doctorado que ahora lo que más quiero es que lo hagas parte de ti. Al mismo tiempo quiero agradecer a Susana, tu esposa, todas sus manifestaciones de cariño y apoyo que ha tenido durante esta etapa.

A mi pequeño cachorrito, Laia, que tanto tengo que agradecer. Agradecerte todas las angustias y presiones que durante nueve meses compartimos juntas, realizando parte del trabajo que se describe en esta tesis. Agradecerte todos los momentos que no hemos podido compartir, agradecerte todo lo que me enseñas día a día. Gracias mi pollito, por ser la máxima ilusión para terminar este camino. Gracias por las miles de sonrisas, abrazos y “te quiero” que me brindas. Gracias por mantener a mami dinámica, presa de tus aventuras. Gracias hija por existir y cambiar mi vivir. A ti hija mía te dedico este trabajo.

Agradezco a Carlos Coronell Coronell, por llenar de calidez barranquillera mi corazón cachaco bogotano. Gracias por que en los momentos difíciles has tomado mi mano y sin más que nuestro amor hemos luchado por terminar ambos esta meta. Gracias por tus clases de “jefología”, que tan útiles serían en el programa de doctorado. Gracias a ti Barcelona se convirtió en nuestro punto de encuentro y realización tanto personal como profesional.

Quiero agradecer muy especialmente a mis abuelos, Berta Belalcazar (QEPD) y Marciano Guerrero (QEPD), por su dedicación a mí. A ti abuelito, te hubiera gustado verme en esta etapa, no olvido tus enseñanzas ni tampoco el significado que le diste a mi vida. Donde estés, gracias abuelo por aportar tanto a mi educación. A ti abuela, gracias por dejarme descubrir la naturaleza, sé que mi instinto investigativo se desarrollo durante todas las etapas que en el campo compartí contigo y mis tíos. Gracias abuelita por haber sido valiente, puedes sentirte orgullosa de lo que has sembrado, este trabajo es también fruto de todo ese esfuerzo y es una lástima que no hayas alcanzado a tenerlo en tus manos.

Agradezco a la familia Coronell Coronell, por todo su apoyo que me han brindado, en especial a Doña Edith y Pilar que siempre han estado pendientes de nuestros pasos.

Agradezco a Alexandra, Javier y Gustavo, mis amigos en Colombia que han estado dispuestos a todo momento a impulsarme en esta locura a pesar de haber perdido tanto de mi mundo natal y de sus vidas. Gracias por comprenderme y siempre apoyarme.

Agradezco a la Dra. Maria Caridad Cepero de García, M.Sc. Profesora Asociada del Departamento de Ciencias Biológicas, de la Universidad de los Andes (Santa Fe de Bogotá-Colombia), por darme la oportunidad de empezar en el mundillo de la ciencia. A ti agradezco la disciplina metodológica que tan útil ha sido para mí desarrollo profesional.

Agradezco a la Dra. Elizabeth Castañeda, Ph.D., Subdirectora de Investigación del Instituto Nacional de Salud (Santa Fe de Bogotá-Colombia), por haberme dado la oportunidad de realizar mi año de servicio social obligatorio en su grupo. Ahí di mis primeros pasos, en el mundo de la biología molecular. Igualmente agradezco a la Dra. Nelly Ordóñez, quien me guió durante ese período y siempre me impulso a realizar mi doctorado en el extranjero.

Agradezco al Dr. Edmond J. Yunis, del departamento de Cancer, Inmunología y SIDA de la Escuela de Medicina de la Universidad de Harvard y del Instituto de Cáncer Dana-Farber (Boston-EEUU). Gracias por haberme dado una oportunidad tan maravillosa como la que viví durante esos dos años en Boston. Gracias por haber confiando y apostado por mí. Gracias por que en su laboratorio hice parte de su escuela y me hice mayor en todos los aspectos, tanto personal como profesional. En él descubrí la verdadera cara de la ciencia y del amor. Sin esos años no hubiera llegado hasta aquí y este doctorado no hubiera sido posible.

No puedo olvidar de este período de vida en Boston al Dr. Julio C. Delgado, quien confió en mi capacidad profesional y me impulsó a seguir adelante en mi formación y al Dr. Gary Pestano, quien en sus ratos libres, me enseñó el universo de la inmunología y de la experimentación animal, gracias por las madrugadas hablando de ciencia, gracias por ayudarme a salir adelante e impulsarme a seguir con mi doctorado.

En España a las primeras personas quienes me agradecería agradecer, son Juan Belles Chiva y Rosario Cobos (QEPD). Muchas gracias por la calidez y cariño que han tenido para conmigo. Rosario fue como una madre adoptiva para mí, siempre tan cariñosa, atenta y sobretodo tan llena de vida, tantas cosas que aprendí de ella. A “mi Juan”, gracias por todo el apoyo que me has brindado. Sin ese cariño tan lindo no hubiera podido salir adelante en los momentos difíciles.

Agradezco a Fernando Pueyo Muñoz, siempre tan especial y atento. Muchas gracias por brindarnos tu amistad y tu ayuda y sobre todo las miles de veces que te has reído de toda esta locura llamada doctorado, por fin Fernando he llegado a este punto.

Agradezco a una pareja de argentinos muy especiales, Mariano Spinelli y su esposa Débora Gherstenfeld, quienes siempre nos han brindado una mano durante todo este tiempo. Gracias Mariano, por toda la colaboración que me has brindado en la edición y diseño de esta tesis.

Ahora me acerco a las personas que conforman la unidad de Farmacología, en especial agradezco al Dr. Jordi Segura Noguera, Director de la Unidad y del laboratorio de Control Antidopaje de Barcelona. Gracias por tenderme la mano en los momentos más difíciles y creer en mi capacidad. La verdad no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí. Muchas gracias por escucharme, por ayudarme y aun más por confiar en mí calidad profesional. He aprendido y dado mucho de mí durante estos 7 años. Farmacología se convirtió en mi familia. Me siento orgullosa de formar parte de esta escuela. Muchas gracias Jordi, espero no haberte defraudado!.

Agradezco igualmente al Dr. Jose Antonio Pascual Esteban, director de esta tesis. Gracias por enseñarme a ser consciente y crítica de mí alrededor. Durante estos años he adquirido la madurez investigadora fruto de la dinámica del trabajo que hemos desarrollado todos estos años juntos. Gracias por instruirme en la constancia y la paciencia, madre de la ciencia y don del sabio.

Agradezco al Dr. Ricardo Gutiérrez Gallego quien me adopto cálidamente sin reservas. Gracias por todo el tiempo que has dedicado a mi trabajo y en especial a esta tesis. Muchas gracias por todo lo que me has enseñado tanto a nivel personal como profesional y sobretodo gracias por todos los momentos apasionados de discusión científica que has tenido con esta colombiana.

Agradezco a la Dra. Rosa Ventura Alemany, todas sus observaciones para el desarrollo de esta tesis, además de todo el apoyo que me ha brindado para poder culminar este punto.

Agradezco a la Dra. Carmen de Bolos, toda la colaboración que me ha brindado durante el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a Montse Ventura por todos tus buenos consejos, por estar dispuesta a escucharme sin más, gracias por las miles de veces que has estado siempre dispuesta a ayudarme a encontrar vías y razonamientos a mis problemas cotidianos con mi tesis y mi vida. Gracias por ayudarme a ver la vida con ojos catalanes y ser una verdadera amiga.

Agradezco muy especialmente a todos mis compañeros del grupo de Farmacología, en especial a Belén, Inmaculada, Mariola, Esther, Isaura, Charo y David, sin su ayuda y apoyo no hubiera sido posible el desarrollo de este trabajo. Gracias de corazón a todos.

Finalmente, agradezco al Profesor Jacques de Ceaurriz y la Dra. Françoise Lasne del Laboratoire national de dépistage du dopage (Châtenay-Malabry, Francia), por haberme dado la oportunidad de instruirme en su laboratorio y compartir con su equipo de trabajo. Igualmente al Dr. Costas Georgakopoulos y su grupo, por permitirme participar y vivir de una experiencia tan única como la de participar en el control antidopaje de la EPO durante los Juegos Olímpicos de Atenas (2004). Todas ellas me han ayudado en mi formación y desarrollo de mi tesis.

MOTIVACIÓN PERSONAL

Cuando era niña buscaba desesperadamente en las zarzamoras los nidos de los pájaros, para ver los huevos de colores azules y los pollitos salir. Me metía en la jaula de los cuí (cobayas) a oscuras para ver como corrían cuando les iluminaba sus cuerpos. Desde niña me gustaba la naturaleza y su entorno, sentía la tierra debajo de mis pies descalzos y me deslizaba por las colinas sembradas de maíz en el pueblo de mi abuela, con la idea de encontrar una mazorca de color rojo-amarillo o habas dulces. En el Colegio Eucarístico, participaba activamente en las clases de química, física y biología, recuerdo ofrecerme a extraer un ojo de la cabeza de un ternero con el objetivo de estudiar su morfología, nunca olvidaré a todas mis compañeras observando como con el bisturí extraía aquel pequeño órgano. Y aunque algunos animales me causan miedo y aun grito al ver una mariposa negra gigante, muy común en Bogotá, no puedo negar que siempre me atrajo dos ideas en mi cabeza la de investigar y la de luchar por los derechos del pueblo colombiano. No obstante esta última opción fue sellada en mi vida cuando en el año 1989 mataron a tiros a Luis Carlos Galán, un colombiano que podía haber cambiado la situación actual y la historia de mi país. Con solo 15 años y a punto de entrar a la universidad sentía que mi vida era un universo y solo hasta los 17 años pude decidirme a ayudar a la sociedad mediante la búsqueda y solución de problemas de algunos aspectos biológicos humanos.

Durante los cinco años que estuve en la universidad exploré todas las opciones que me brindaban mi profesión, la bacteriología, desde el primer momento mis profesores me ayudaron a introducirme en el mundo de la investigación, me olvide de todo el entorno de la universidad por adentrarme en el mundillo del laboratorio, de la experimentación con animales, de la inmunología y en menos de lo que recuerdo tenía claro que el siguiente paso sería mi doctorado.

Pero para una mujer como yo, sin padrinos como decimos en Colombia, todo estaba por hacer, sabía que tenía un largo camino y que sin dedicación no llegaría a este objetivo. Me dedique a trabajar mientras estudiaba, todas mis practicas clínicas hospitalarias las terminaba ubicando en áreas de investigación clínica o básica. Opte por un proyecto de tesis de pregrado a nivel de investigación en el área de la inmunología de la artritis reumatoide, en el Hospital San Juan de Dios, de la ciudad de Bogotá. Todo me parecía posible siempre que mis sueños fueran mi destino.

Durante el servicio social obligatorio o rural (tiempo en que los profesionales del campo de la salud, trabajan en áreas rurales dando un servicio a la comunidad), pensé que daría un descanso obligado a mi pasión por investigar. Sin embargo y gracias a todos esos años universitarios trabajando con la Dra Maria Caridad García, en el Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de los Andes en Bogotá, pude optar a una de las pocas plazas de investigación en biología molecular en el Instituto Nacional de Salud. Así que una vez más la madre ciencia me permitía seguir en los mimos de sus brazos.

Mis primeros contactos con el ADN fueron durante ese período, pude trabajar con *Vibrio cholerae* y *Cryptococcus neoformans*. Durante ese año aplique a una beca que permitiera irme a un lugar de habla inglesa con el objetivo de realizar una inmersión total en la lengua. Justo 10 días después de haber terminado mi rural tome un avión para ir a la Universidad de Delaware en la ciudad de Newark, para realizar un curso intensivo de 6 meses. Sin saber ese día había tomado rumbo a mis sueños y sin pensar aquella decisión me había separado de mi tierra sabanera y de los atardeceres de venado que tanto extraño de Bogotá.

De esta forma y para llegar a escribir estas cortas letras, deje a mi familia, mi mundo, amigos y mi país. Muchos seres queridos se han ido durante esta etapa, en especial mi abuela. Han sido años donde he vivido en culturas diferentes y bajo situaciones diversas. En Delaware y luego en Boston pude por fin soltar mi lengua y hablar en inglés, me esforcé por

buscar una oportunidad y la encontré en el laboratorio de inmunogenética, del Dana Farber Cancer Institute. El director del grupo, el Dr. Edmond Yunis se convirtió para mí en un gran profesor con un gran don, el del buen trato a las personas. No olvidaré el primer día que llegue al área médica de la Universidad de Harvard, en Boston, como tampoco mi primera nevada. Fueron años donde el entorno que me rodeaba hizo romper definitivamente el cordón umbilical que me unía a mi tierra. Pero a su vez fueron los años más enamoradizos que tuve con la ciencia y la naturaleza. Disfrutaba de las charlas magistrales de premios nobel, durante horas realizaba largos experimentos donde el tiempo no parecía importar sino la ansiedad de conseguir un resultado positivo, pasaba horas en la biblioteca “ Francis Countway”, disfrutaba de sus salas de estudio y sin darme cuenta llegaba la noche, aprendí de gente que sin más se ofrecía a enseñarme. Durante esos años aprendí tanto de inmunología, me apasione de nuevo por la idea de seguir tras mis sueños y aunque estos de nuevo me hicieron dejarlo todo ahí, jamás podré olvidar todo lo que la vida y la ciencia me brindaron en la ciudad del “Charles river” y los “Red Sox”.

La idea loca del doctorado me llevo a Barcelona y heme aquí, hace 8 años que vivo en esta ciudad. Ella me ha enamorado con el suave baile del mediterráneo y la lealtad catalana a su historia y costumbres. No imagine nunca vivir en una ciudad como esta y menos establecer mi vida. Barcelona me ha brindado un segundo hogar, la posibilidad de culminar un sueño y en ella se gesto la maravilla de poder tener otro tipo de doctorado, el de ser madre. Uno que nunca hubiera podido llegar a optar, pero que me ha vuelto a demostrar que más allá de la ciencia existe un Dios.

CAPÍTULO 1

ERITROPOYETINA (EPO)

ASPECTOS HISTORICOS DE LA EPO

Paul Bert, fue el primero en concluir que un incremento en el número de los glóbulos rojos es producido cuando la presión barométrica y la presión parcial de oxígeno en sangre arterial (PaO_2) se reducen. Postuló que este fenómeno podía deberse a la presencia de un determinante genético al observar que los animales que vivían en altitudes altas presentaban una mayor capacidad de captación de oxígeno (O_2) en su sangre (Bert, 1882). En 1906, Carnot y Deflandre fueron los primeros en postular un proceso humoral para la regulación de la eritropoyesis que denominaron como “*hemopoietin*” (Carnot & Deflandre, 1906). Su hipótesis se basó en el incremento de los glóbulos rojos tras la administración de suero de conejos anémicos en animales sanos. Sin embargo, sus experimentos fueron difíciles de reproducir y solo hasta 1948 Bonsdorff y Jalavisto denominan al mediador humoral de la hematopoyesis como eritropoyetina (EPO) (Bonsdorff & Jalavisto, 1948). Finalmente, los trabajos de Reissmann y Alan Erslev probaron la existencia de la EPO y además llevaron a plantear la posibilidad de utilizar este factor en el tratamiento de la anemia (Erslev, 1953; Reissmann, 1950).

Los trabajos realizados por Espada *et al* y Miyake *et al* fueron los primeros en describir la purificación de EPO a partir de litros de orina (Espada & Gutnisky, 1970; Miyake *et al*, 1977). A partir de la obtención de EPO, se caracterizó la secuencia de aminoácidos de la glicoproteína, permitiendo posteriormente la clonación del gen en 1985 y la obtención de EPO humana recombinante (rEPO) (Fandrey, 2004; Fried, 1995; Jacobs *et al*, 1985; Lin *et al*, 1985).

En 1986 se publicaron los primeros ensayos clínicos de fase I y II, donde se utilizó rEPO en pacientes con anemia por falla renal crónica (Winearls *et al*,

1986). Hoy en día son comercializados diferentes productos farmacéuticos de rEPO, entre ellos están epoetin alfa, epoetin beta y epoetin omega. Diez años después de la comercialización de rEPO, en 1997 se publicó por primera vez la generación del primer análogo de rEPO, denominado Darbepoetina alfa (NESP, sigla en inglés de *Novel Erythropoiesis Stimulating Protein*) (Egrie J.C. *et al*, 1997). Los primeros ensayos clínicos en pacientes con falla renal demostraron que NESP posee una actividad biológica superior a la observada en rEPO (Macdougall *et al*, 1999).

Actualmente una amplia gama de agentes terapéuticos que estimulan la eritropoyesis están en fase de desarrollo, como es el caso de la epoetina delta (dynepo), del activador continuo del receptor de la EPO, CERA (sigla en inglés de *Continuous Erythropoietin Receptor Activator*), SEP (sigla en inglés de *Synthetic Erythropoiesis Protein*), epoetin beta pegilada y miméticos de EPO capaces de inducir la dimerización del receptor (*v.gr.* péptido mimético de EPO, proteína de fusión dimérica de EPO o el metabolito activo de la vitamina D) (Barbone *et al*, 1999; Biazzo *et al*, 2000; Kochendoerfer *et al*, 2003; Macdougall, 2005; Pratt, 2006; Shahrokh *et al*, 2006).

Otras vías a nivel terapéutico se están estudiando como es el caso de la terapia génica. Son varios los estudios en animales donde se han utilizado células autólogas de músculo liso o mioblastos infectados con vectores virales que contienen el gen de la EPO o regiones del ácido desoxirribonucleico (ADN) que aumentan la transcripción del gen de la EPO, como es el caso de la región promotora denominada elemento de respuesta a la hipoxia (HRE, sigla en inglés de *Hypoxic Response Element*). La activación de promotores o del gen se produce bajo el estímulo de la hipoxia o la ingesta de antibióticos que finalmente conllevan a la producción de EPO y por consiguiente a una elevación de los reticulocitos, hemoglobina (Hb) y hematocrito (Hcto) (Choi *et al*, 2007; Osborne *et al*, 1995; Rivera *et al*, 2005; Ye *et al*, 1999).

En humanos se ha reportado el uso de un mecanismo denominado "Biopump", el cual consiste en un tejido dérmico autólogo que contiene un

adenovector diseñado con el objetivo de expresar EPO bajo el control de un promotor. Los resultados iniciales demuestran una producción durante los primeros 14 días en pacientes con falla renal crónica. Sin embargo, los autores plantean la necesidad de realizar estudios adicionales que permitan evaluar la respuesta inmunológica que pueda ocasionar el implante (Lippin *et al*, 2005).

PROPIEDADES QUIMICAS DE LA EPO

El gen de la EPO humana contiene 4 intrones y 5 exones, está localizado en el cromosoma 7, su ácido ribonucleico mensajero (ARNm) codifica una cadena polipeptídica de 193 aminoácidos. Esta cadena es modificada durante el proceso de secreción de la proteína, donde pierde la secuencia de señalización compuesta por 27 aminoácidos en la región N-terminal. Debido a modificaciones post-transduccionales se pierde una arginina en la región C-terminal, dando como resultado final a nivel de estructura primaria una cadena de 165 aminoácidos y dos puentes di sulfuro entre las cisteínas: (7-161) y (29-33), la reducción de estos puentes resulta en una pérdida total de la bio-actividad de la molécula (Maiese *et al*, 2005; Sasaki *et al*, 2000m).

El peso del producto de la cadena de aminoácidos es de 18396 Da; se caracteriza por presentar una estructura secundaria compuesta por 4 hélices alfa (A, B, C y D) y varios espirales (AB, BC y CD) (Lai *et al*, 1986; Wen *et al*, 1994).

El peso real de la molécula es de 30000 Da, este aumento en su masa se debe a la presencia de 4 cadenas glicosiladas producto de modificaciones a nivel post-transduccional. Las cadenas glicosiladas son de 2 tipos: N-glicosídicas (3 cadenas ubicadas en las posiciones Asn24, Asn38 y Asn83) y O-glicosídica (una cadena ubicada en la posición Ser126), todas juntas representan aproximadamente el 40% del peso total y son consideradas parte esencial en la actividad biológica de la molécula (Fried, 1995; Maiese *et al*, 2005; Sasaki *et al*, 2000l).

Figura 1: Propiedades químicas de la EPO

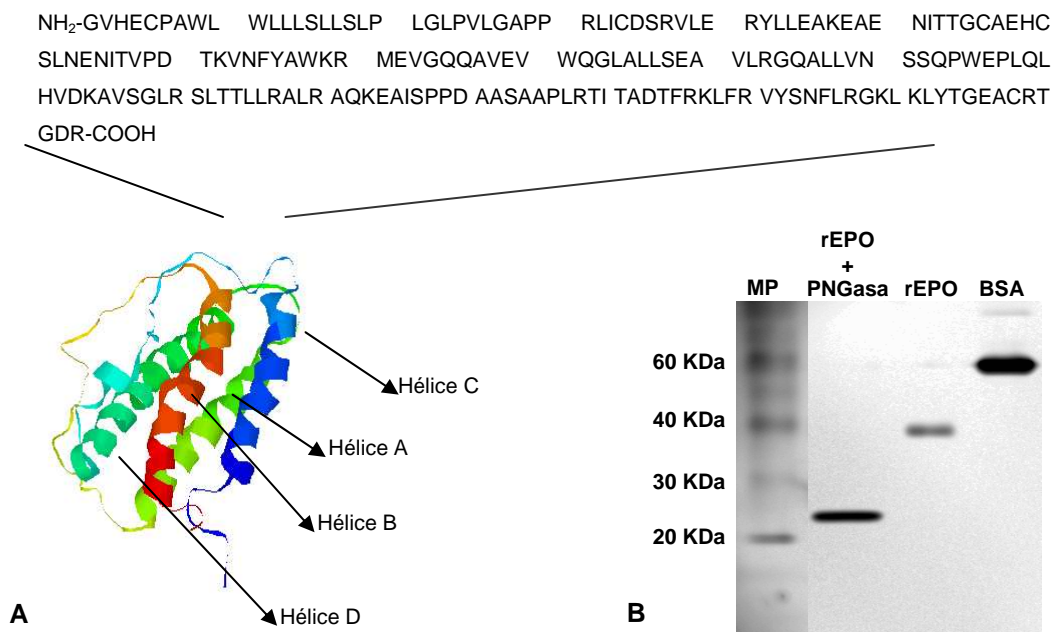


Figura 1: Propiedades químicas de la EPO: **A:** Estructura primaria y secundaria de la EPO. En el modelo molecular de la estructura secundaria, se observa la eritropoyetina desnuda sin cadenas de azúcares y las diferentes hélices. Imagen modificada de la estructura secundaria con ref. PDB 1BUY. **B:** Perfil electroforético de la EPO de-glicosilada y glicosilada en un gel con dodecil sulfato sódico (SDS, sigla en inglés de *Sodium Dodecyl Sulfate*).

CADENAS DE AZÚCARES

Estructura y función general

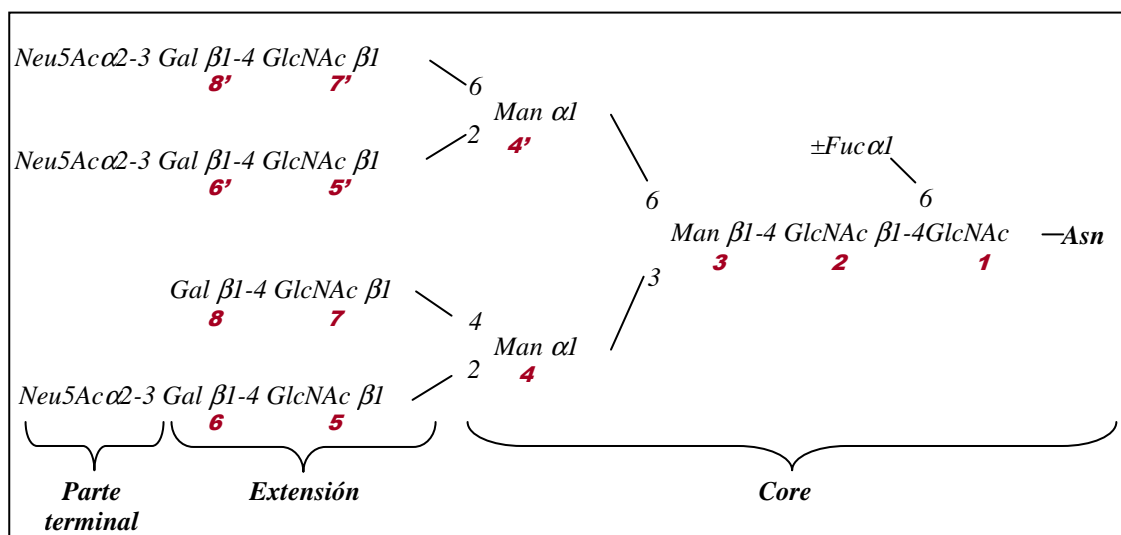
La estructura de los azúcares que componen las cadenas glicosídicas, son el resultado del proceso de glicosilación que ocurre a nivel post-transduccional (Furukawa & Kobata, 1992). Este proceso no está determinado directamente por el contenido genético del huésped y varía de acuerdo a la estructura peptídica de la proteína, a la presencia, concentración, cinética y ubicación de las glicosiltransferasas y glicosidasas disponibles en el huésped, de las condiciones fisiológicas del organismo, del estado de desarrollo de la célula, como de las condiciones y tipo de cultivo (*v.gr.* concentraciones de glucosa o

de amonio) en el caso de las proteínas recombinantes (Goochee *et al*, 1991; Grabenhorst *et al*, 1999; Takeuchi & Kobata, 1991a). Debido a todos estos factores, se puede encontrar que un mismo tipo de célula, produzca una misma glicoproteína con un grado de variación estructural, este fenómeno ha sido denominado microheterogeneidad (Varki *et al*, 1999).

La microheterogeneidad da como resultado que una misma glicoproteína con un solo punto de glicosilación pueda existir en diversas glicoformas y a su vez isoformas; esta variedad influye en la actividad biológica y puede ser útil en la diferenciación entre glicoproteínas.

El análisis estructural de las cadenas de azúcares de la EPO urinaria humana (uEPO) y de la rEPO producida en células de mamíferos, ha permitido describir que las cadenas de tipo N se caracterizan por estar compuestas por: un “core” (Man3GlcNAc(±Fuc)GlcNAc), una extensión (GlcNAc, Mans) y una parte terminal (Neu5Ac, Gal, GalNAc, repeticiones de *N*-acetil-lactosaminas, etc), (Choi *et al*, 1996c; Takeuchi & Kobata, 1991b), ver figura 2:

Figura 2. Representación esquemática de la estructura general de las cadenas de tipo N, en la EPO.



Se ha descrito que el “core” participa en el mantenimiento de la conformación particular del polipéptido, las extensiones están involucradas en el proceso de transmisión de señales al órgano blanco donde actúa la glicoproteína y la

parte terminal determina la vida media, la transmisión de señales y la actividad *in vivo* de la glicoproteína en el torrente sanguíneo (Choi *et al*, 1996b; Cointe *et al*, 2000).

Algunos estudios han observado que tras la eliminación de los ácidos siálicos se produce una pérdida de la actividad *in vivo* de la proteína, debido a la exposición de la galactosa que es rápidamente reconocida por una lectina de unión a asialoglicoproteínas en la superficie del hepatocito, este proceso inicia la endocitosis y degradación de la glicoproteína en el lisosoma (Takeuchi *et al*, 1990; Wasley *et al*, 1991). Sin embargo, se ha observado que la actividad *in vitro* es incrementada (Fukuda *et al*, 1989; Linsley *et al*, 1994; Misaizu *et al*, 1995; Takeuchi *et al*, 1988) y que un mayor contenido de ácidos siálicos produce un incremento en la actividad *in vivo*. Se ha postulado que este fenómeno se puede deber al aumento en el tamaño hidrodinámico de la molécula ocasionado por la presencia de ácidos siálicos. Este aumento puede reducir la unión al receptor al alterar las interacciones electrostáticas entre el receptor y la EPO, ya que un ácido siálico está cargado negativamente a un pH fisiológico y puede disminuir la unión al receptor a través de la repulsión de cargas (Elliott *et al*, 2004).

La estructura de los N-glicanos tiene un papel importante en la conducción de señales en la médula ósea, la secreción de la molécula, el transporte de la hormona a los órganos blancos, el control de la vida media y la actividad biológica *in vivo* (Cointe *et al*, 2000; Misaizu *et al*, 1995; Wasley *et al*, 1991). La eliminación de estos, al igual que de los ácidos siálicos que forman parte de los N-glicanos, conlleva a la pérdida de la actividad *in vivo* mientras la actividad *in vitro* es preservada (Rahbek-Nielsen *et al*, 1997a; Wasley *et al*, 1991c). El patrón de las extensiones como el número de ácidos siálicos determinará la vida media (metabolismo), la farmacodinámica y la actividad biológica (Skibeli *et al*, 2001; Takeuchi *et al*, 1989).

En el caso de las cadenas de tipo O, están constituidas por Gal β 1-3GalNAc que pueden tener 0, 1 ó 2 Neu5Ac, estos pueden estar unidos a una

galactosa y un posible segundo Neu5Ac unido a GalNac. No es clara su función con respecto a la actividad biológica. Sin embargo, se ha demostrado que la ausencia de la cadena O glicosilada no modifica la actividad biológica *in vivo* (Takeuchi & Kobata, 1991; Wasley *et al*, 1991). Algunos autores plantean que puede llegar a influenciar la inmunoreactividad (Storring *et al*, 1996).

Estructura de los azúcares presentes en la uEPO

El análisis de los azúcares se ve limitado por diferentes variables: la cantidad necesaria para detectar estas estructuras, la pureza requerida en el momento de ser analizada, el porcentaje de glicosilación y la heterogeneidad. Por ejemplo, las glicoproteínas que se encuentran en fluidos como orina o sangre, a bajas concentraciones y en presencia de otras proteínas, estos aspectos toman mayor importancia, como es el caso de la EPO.

Actualmente, son pocos los trabajos que han investigado la estructura que caracteriza los azúcares en la uEPO. Los estudios publicados, varían de acuerdo al origen, las condiciones patológicas y los métodos de purificación utilizados, por tal razón se observa discrepancias en los valores relativos de las abundancias de las estructuras descritas. Se ha observado que las cadenas N-glicosídicas presentes en la uEPO se caracterizan por estar compuestas por cadenas fucosiladas complejas de tipo tetraantenarias, seguidas en forma minoritaria por cadenas de tipo triantenarias y biantenarias. En la posición Asn24 se observa la mayor heterogeneidad, presentado cadenas de todos los tres tipos, bi-, tri- y tetraantenarias, mientras las unidas a las posiciones Asn38 y Asn83 contienen principalmente cadenas tri y tetraantenarias. Todas contienen pequeñas cantidades de cadenas tetraantenarias con repeticiones de *N*-acetillactosamina. Cerca del 80% de las cadenas presentan una fucosa unida a los residuos GlcNAc y en una pequeña proporción pueden contener repeticiones de *N*-acetil-lactosamina (Rahbek-Nielsen *et al*, 1997; Takeuchi & Kobata, 1991).

En el caso de las cadena O-glicosídica poca es la información descrita, las estructuras descritas mayoritariamente son: GalNAc y Neu5Ac α 2-6GalNAc. Sin embargo, se ha reportado la presencia de estructuras de tipo Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc, como también Gal β 1-3GalNAc (Inoue *et al*, 1993; Kamerling, 1996; Storring *et al*, 1996).

Los ácidos siálicos presentes en la uEPO están unidos a las posiciones C3 y C6 de los residuos de galactosa, las uniones de tipo Neu5Ac α 2,3 son las mayoritarias (60%) mientras las de tipo Neu5Ac α 2-6 se encuentran en un 40% (Takeuchi *et al*, 1988).

Debido a que cada ácido siálico contribuye a la carga neta de la molécula como una carga negativa, el contenido de ácidos siálicos determinará el punto isoeléctrico (pI) de la glicoproteína (Imai *et al*, 1990).

El pI se define como el pH al que una sustancia anfótera tiene carga neta cero. Utilizando técnicas como el isoelectroenfoque (IEF) o la electroforesis capilar, se ha observado por ejemplo que la uEPO puede llegar a tener entre 10 a 15 isoformas distribuidas en un rango de pI de 3,8-4,7 (Lasne *et al*, 2002). El perfil de estas isoformas se caracteriza por presentar un patrón compuesto mayoritariamente por isoformas ácidas, sugiriendo que el contenido de ácidos siálicos es abundante (Imai *et al*, 1990; Storring & Gaines Das, 1992; Wide & Bengtsson, 1990), ver figura 3.

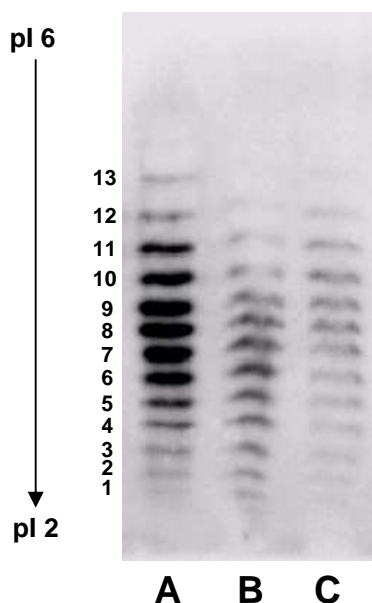


Figura 3: Patrón de isoelectroenfoque de uEPO en un gel de poliacrilamida con un rango de pH de 2 a 6. A: Estándar de uEPO (Segunda preparación internacional de referencia de eritropoyetina urinaria humana preparada por el NIBSC, (sigla en inglés de National Institute for Biological Standards and Control). B y C: uEPO purificada a partir de orina de individuos sanos.

SITIOS DE PRODUCCIÓN DE LA EPO

Los sitios principales de biosíntesis de EPO en mamíferos han sido identificados mediante el uso de técnicas de hibridización *in situ*. Se ha detectado ARNm de EPO principalmente en hígado y riñones. La contribución de cada uno de estos órganos es dependiente de la edad, durante los estadios fetales iniciales la producción se da principalmente en el hígado, mientras a partir de las fases finales de gestación esta función se da principalmente en los riñones (Moritz *et al*, 1997). Utilizando modelos animales (ratón y simios) bajo condiciones de hipoxia, se ha observado que la producción y secreción de la EPO, se da específicamente en los fibroblastos intersticiales peritubulares ubicados en la corteza y la parte más externa de la médula renal (Koury *et al*, 1988; Lacombe *et al*, 1988), ver figura 4.

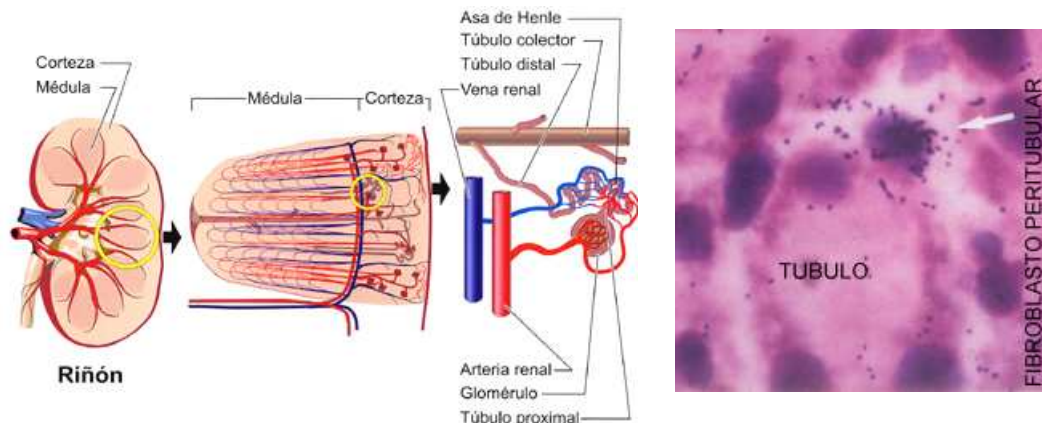


Figura 4: Ubicación anatómica en un riñón humano normal, de dos de las principales áreas de producción de la eritropoyetina, la corteza y médula renal (imagen izquierda). Corte histológico de la corteza renal; identificación de los fibroblastos peritubulares como principales productores de EPO, mediante la técnica de hibridización *in situ* con sonda de ARNm de EPO, imagen modificada de Lacombe *et al*, 1988

Se ha estimado que alrededor del 30% de las células de la corteza renal y de la médula adyacente, agrupadas en los túbulos contorneados proximales, están especializadas para la biosíntesis de EPO (Lacombe *et al*, 1988). Algunos estudios sugieren también otras células renales como posibles sitios de síntesis, es el caso de las células glomerulares epiteliales, células tubulares y células mesangiales (Loya *et al*, 1994; Maxwell *et al*, 1990; Mujais *et al*, 1999).

En la edad adulta, los hepatocitos y las células Ito no parenquimales que rodean las venas centrales en el hígado, pueden llegar a aportar entre el 10-20% de la producción de EPO (Koury *et al*, 1991; Maxwell *et al*, 1994).

Recientemente se ha observado la producción de EPO en órganos como útero, cerebro, corazón, médula ósea y próstata entre otros, ver Tabla 1.

Tabla 1: Sitios de producción de EPO y su receptor en humanos.

Órgano	Expresión de EPO	Expresión del receptor de EPO
<i>Cerebro</i>	Neuronas Astrocitos Microglia	Neuronas Astrocitos Microglia
<i>Sistema vascular</i>	Células endoteliales	Células endoteliales
<i>Corazón</i>	Cardiomiocitos	Cardiomiocitos
<i>Hígado</i>	Células kupffer Hepatocitos Células Ito	
<i>Riñón</i>	Células peritubulares Células mesangiales	Células renales
<i>Médula ósea</i>	Progenitores eritroides	Células mieloides Megacariocitos
<i>Islotes pancreáticos</i> <i>Útero</i>	Útero	Células productoras de insulina Células endoteliales
<i>Próstata</i>		Células epiteliales prostáticas.

*Datos modificados de Weiss, 2003 y Maiese *et al*, 2005.

MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE EPO

La producción de EPO es debida a la activación de la transcripción del gen de la EPO. La hipoxia es uno de los estímulos para la producción de EPO, en personas con una función renal normal, los niveles plasmáticos de la EPO incrementan exponencialmente con la disminución de las concentraciones de Hb, al igual que cuando la PaO₂ disminuye o cuando la afinidad por el O₂ en la sangre aumenta (Beru *et al*, 1986; Jelkmann, 2004; Schuster *et al*, 1989).

La hipoxia puede ser observada bajo ciertas circunstancias, así como en condiciones patológicas, ver tabla 2.

Tabla 2: Causas y condiciones en donde se puede observar hipoxia.

Causas	Condiciones
Reducción PaO ₂ ambiental	Elevada altitud, hipobaría
Disminución transporte O ₂	Anemia
Disminución de la difusión del O ₂ en el pulmón.	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica y Fibrosis pulmonar.
Disminución del flujo sanguíneo renal	Vasoconstricción arteriolas renales, ateromas, trombosis.
Disminución de la utilización de O ₂ en los riñones	Tratamiento con cobalto

A continuación se describen varios mecanismos que se han demostrado para la regulación de la expresión del gen de la EPO bajo condiciones de hipoxia:

1. Secuencias de ADN de tipo “cis-acting”: Se ha observado la presencia de secuencias de tipo “cis-acting DNA” próximas al gen de la EPO; estas secuencias actúan regulando la distribución y expresión del gen en tejidos como hígado o riñón. En el caso de la EPO, pueden ser tanto de tipo inductivo o supresor (Madan *et al*, 1995; Sasaki *et al*, 2000k).

2. Presencia de potenciadores: se ha demostrado la presencia de un *enhancer* o potenciador, al final de la región 5' del gen de la EPO, el cual se une a activadores y otros factores que aumentan la transcripción del gen. Los estudios han identificado dentro de esta región promotora 3 zonas importantes: una zona (5' TACGTGCT 3') denominada HRE, donde se une al factor inducible por hipoxia HIF-1 (sigla en inglés de *Hypoxia-Inducible Factor-1*) un segmento intermedio que contiene repeticiones de tipo CA (CACACA) y un tercer segmento denominado "DR-2 element" (5'-YGACCY-3', Y puede ser C o T). Las dos últimas zonas son características del gen de la EPO y parecen modular la expresión del gen ya sea por la unión de otras proteínas a esta zona o por mecanismos aun no descubiertos. Las mutaciones realizadas en estas zonas produce un bloqueo de las funciones del potenciador (Jelkmann, 2004; Sasaki *et al*, 2000j).

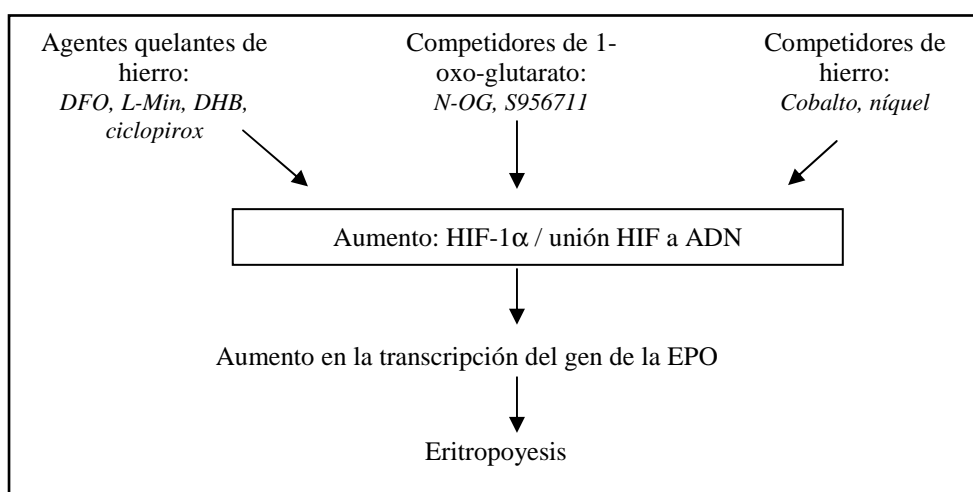
Son varios los estudios que han descrito con más detalle el papel de la zona HRE y su proteína de unión HIF-1. Se sabe que HIF-1 es un heterodímero compuesto por dos subunidades (HIF-1 α , -2 α , -3 α y HIF-1 β), que parece actuar de forma significativa en los procesos de hipoxia. En condiciones de normoxia, las células contienen suficiente O₂, HIF-1 α es hidroxilado y degradado. Mientras en condiciones de hipoxia se bloquea su degradación, debido a la falta de O₂. El aumento de sus niveles, produce la formación de un dímero con HIF-1 β en la zona HRE, desencadenando la activación del gen (Eckardt & Kurtz, 2005; Koury, 2005; Sasaki *et al*, 2000).

En el caso de HIF-1 β , las concentraciones permanecen constantes independientemente de la concentración de O₂. La acción de HIF-2 α es desconocida mientras HIF-3 α suprime la inducción del gen (Eckardt & Kurtz, 2005; Lacombe & Mayeux, 1998; Sasaki *et al*, 2000).

HIF-1 α se expresa normalmente en las células tubulares del riñón y las células no parenquimales del hígado, mientras HIF-2 α se expresa en las células endoteliales peritubulares, fibroblastos del riñón, hepatocitos y células perisinusoidales del hígado (Eckardt & Kurtz, 2005).

En general HIF-1 controla múltiples respuestas a hipoxia como son la adaptación al metabolismo anaeróbico, la eritropoyesis, la angiogénesis, la vasodilatación y la respiración, lo que ha llevado a investigar su posible uso a nivel farmacéutico (ver figura 5).

Figura 5. Regulación de la producción de EPO por HIF-1. DFO: desferrioxamina, L-Mim: L-Mimosina, DHB: 3,4-dihidroxi-benzoato, N-OG: N-oxalilglicina, S956711: *6-chloro-3-hydroxy-chinoline-2-carbonic acid-N-carboxymethylamide*.



Otros factores como monóxido de carbono (CO), la hormona tiroidea, el óxido nítrico y el ácido retinoico han sido postulados como posibles mecanismos de regulación. A nivel de supresión se han descrito otros factores como son GATA-2 y el factor nuclear kappa B (NFκB), estos a su vez pueden ser inducidos por compuestos como L-NMMA (*N*-monometil-L-arginina), interleucina 1 (IL-1) y factor de necrosis tumoral alfa (TNFα, sigla en inglés de *Tumor Necrosis Factor alpha*) (Jelkmann, 2004; Sasaki *et al*, 2000; Tarumoto *et al*, 2000).

3. Mecanismo de sensores de O₂: otro mecanismo de regulación de la expresión del gen de la EPO, es la proteína “heme” (citocromo P558), la cual puede ser un sensor de O₂ que puede cambiar su conformación y actividad dependiendo del contenido intracelular de O₂ (Koury, 2005).

Se ha observado que en condiciones de hipoxia las células inhiben la producción de EPO cuando son expuestas a CO. Debido a que este compuesto se une de igual manera que la Hb, se ha postulado que puede estabilizar al sensor, bajo una forma oxidada, dando como resultado la inhibición de la señal de transducción inducida por la hipoxia. En el caso contrario, el cobalto (Co²⁺) o la deferoxamina pueden sustituir al hierro (Fe) en el sensor, pasando este a una forma desoxi que produce un estímulo en la expresión del gen a pesar de estar en condiciones de normoxia (Goldberg *et al*, 1988; Koury, 2005; Sasaki *et al*, 2000).

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA EPO

Eritropoyesis

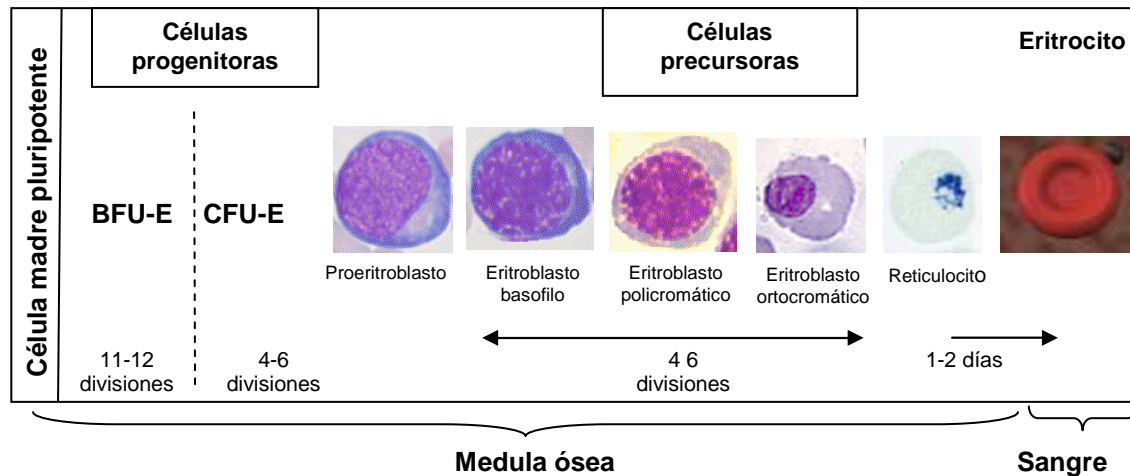
Una vez la EPO es secretada pasa del torrente sanguíneo a la médula ósea donde se lleva a cabo la transformación de la célula madre primitiva pluripotencial a los estadios que darán origen al eritrocito en la sangre, proceso llamado eritropoyesis.

El proceso de eritropoyesis está compuesto por varios estadios de maduración como se observa en la Figura 6. En la médula ósea se encuentran los progenitores y precursores hematopoyéticos. La célula madre común totipotente da lugar a los progenitores pluripotentes. El primer progenitor identificado actualmente en los humanos es la célula madre pluripotente denominada célula madre linfomieloide (CFU-LM, sigla en inglés de *Colony Formation Unit-LymphoMyeloid*). La CFU-LM da origen a la célula germinal linfoide (CFU-L, sigla en inglés de *Colony Formation Unit-Lymphoid*) y la célula germinal mieloide (CFU-M, sigla en inglés de *Colony Formation Unit-Myeloid*) (Woessner & Florensa, 2000).

Estos estadios tiene la capacidad de autorenovación, autoreplicación y diferenciación a más de una línea celular, el proceso genera los progenitores

responsables que dan origen a las líneas celulares hematopoyéticas (Ayala-Díaz *et al*, 2001).

Figura 6: Proceso de eritropoyesis. Imágenes de los diferentes estadios de la línea eritroide que conducen a la formación de eritrocitos.



Este proceso está influenciado por el microambiente y la presencia de varios factores de regulación como son: Factor de células madres (SCF, sigla en inglés de *Stem Cell Factor*), las interleucinas IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, el Factor estimulante de Colonia de Granulocitos y Macrófagos (GM-CSF, sigla en inglés de *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) y el factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1, sigla en inglés de *Insulin-Like Growth Factor-1*) (Fisher, 2003).

En el caso de la línea eritroide, la CFU-M da lugar a las poblaciones comprometidas de forma irreversible a la formación de eritrocitos. Los estadios generados en esta etapa son denominados células o unidades formadoras de colonia (CFU, sigla en inglés de *Colony Formation Unit*), en el caso de la línea eritroide se conocen los siguientes estadios: unidad formadora de colonias eritroides grandes primitivos (BFU-E, sigla en inglés de *Burst-Forming Unit Erythroid*), BFU-E tardíos o maduros y unidad formadora de colonias eritroides pequeñas (CFU-E, sigla en inglés de *Colony-Forming Unit Erythroid*) (Woessner & Florensa, 2000).

La EPO junto con SCF, GM-CSF, IL-3, IL-4, IL-9 y IGF-1 actúa sobre BFU-E, y CFU-E, induciendo la maduración y proliferación (Fisher, 2003e). Específicamente CFU-E posee el mayor número de receptores de EPO y requiere de elevados niveles de este factor para llevar a cabo la maduración eritroblástica (Jelkmann, 2004).

A medida que BFU-E adquiere progresivamente receptores para la EPO, se diferencia y madura a CFU-E. A partir de este estadio la célula pasa por los siguientes estadios: proeritroblasto, eritroblasto basófilo, eritroblasto policromático, eritroblasto ortocromático y reticulocito. Estos últimos duran 2 días en la médula ósea y luego son liberados al torrente sanguíneo donde terminan su maduración (Woessner & Florensa, 2000). En la sangre, los reticulocitos remueven los restos nucleares (cuerpos de Howell-Jolly) y remodelan la membrana celular madurando finalmente a eritrocito (Fisher, 2003; Fried, 1995). En condiciones de altas concentraciones de EPO (*v.gr.* anemia severa) los reticulocitos pueden llegar a ser liberados de la médula ósea inmediatamente o durar solamente 1 día en ella (Fried, 1995). Los reticulocitos tienen cierta capacidad para la síntesis de ARN y proteínas, por la persistencia de algunas mitocondrias, ribosomas y restos de retículo endoplásmico. Los valores normales en humanos de reticulocitos en sangre periférica oscilan entre $35-75 \times 10^9/L$.

El eritrocito o hematíe es el estadio final de la eritropoyesis, su función es la de permitir el intercambio gaseoso ($O_2 \leftrightarrow CO_2$) entre los tejidos y los pulmones, mediante la Hb. El hematíe tiene un diámetro de 6-8 μm y una morfología de disco bicóncavo que le permite tener una elevada capacidad de deformación que garantiza la llegada de O_2 a los capilares. En condiciones normales, los eritrocitos tienen una vida media de 120 días aproximadamente y diariamente un 0,8% del total son destruidos y remplazados (Fried, 1995). Los valores normales en humanos son de $4,7-4,9 \times 10^{12}/L$ para las mujeres y de $5,4-5,6 \times 10^{12}/L$ para los hombres.

El eritrocito no presenta núcleo ni estructuras citoplasmáticas, está compuesto estructuralmente por una membrana, Hb y una pequeña dotación de enzimática, imprescindible para mantener un reducido metabolismo. La membrana está compuesta por una bicapa lipídica donde se hallan parcial o totalmente sumergidas diversas proteínas. La Hb, el componente mayoritario de los eritrocitos, es una proteína de 68000 Da, formada por cuatro subunidades, con un grupo hemo en cada una de ellas, de los cuales depende la unión del O₂. Cada molécula de Hb puede unirse por tanto a cuatro moléculas de O₂, la unión es reversible, cuando la concentración de O₂ o PaO₂ es elevada, el O₂ se une a la Hb hasta saturarla, mientras que en la situación contraria, el O₂ es liberado en los tejidos.

El mecanismo primario de acción por el cual la EPO mantiene la eritropoyesis es mediante la prevención de la muerte celular programada o apoptosis (Jelkmann, 2004). Este proceso depende en suma medida de la interacción de la proteína con su respectivo receptor que será descrito más detalladamente en el siguiente capítulo.

Receptor de la EPO: mecanismos de señalización y transducción

Los reticulocitos y los eritrocitos no presentan receptores de la EPO, estos se empiezan a observar en los estadios BFU-E, alcanzando su máxima concentración en los estadios CFU-E (Jelkmann, 2004). La cantidad disminuye gradualmente a medida que la célula va madurando, se ha estimado que puede llegar a haber de 300 a 1000 receptores por célula (Lacombe & Mayeux, 1998).

El receptor de la EPO es una glicoproteína de 484 aminoácidos, compuesto por una secuencia hidrofóbica transmembranal y 2 dominios: un dominio citoplasmático variable, necesario para la generación de señales de diferenciación y proliferación y un dominio extracelular, compuesto por una región constante caracterizada por la presencia de 4 cisteínas además de una secuencia motivo: "Trp-Ser-X-Trp-Ser" (donde X puede ser cualquier

aminoácido). Este dominio controla el proceso de señalización, reduciendo la respuesta (Jelkmann, 2004; Sasaki *et al*, 2000).

La unión de la EPO al receptor depende en parte del contenido de azúcares de la EPO. La afinidad del receptor disminuye con la glicosilación, aparentemente por los efectos estéricos y las fuerzas electrostáticas que puede generar las cadenas de azúcares. Este hecho puede explicar la prolongada vida media que se observa en pacientes al usar una molécula hiperglicosilada, como es el caso del NESP, un análogo de la EPO que contiene 2 cadenas de azúcares adicionales (Jelkmann, 2004).

La unión EPO-receptor conlleva un cambio conformacional en el receptor, la EPO se une al dominio extracelular de un receptor y luego se une a un segundo receptor, formando un homodímero (ver figura 7).

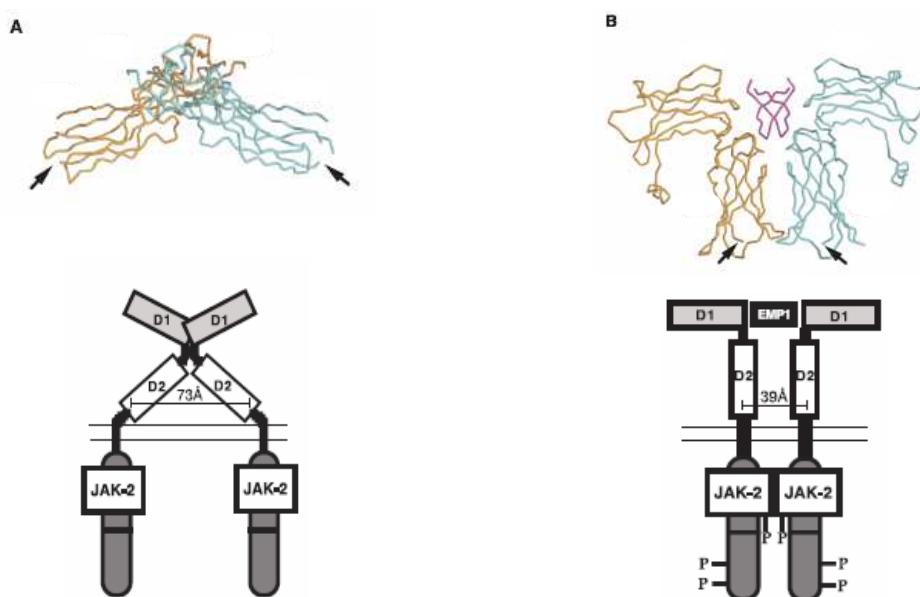


Figura 7: Configuración del receptor de la EPO, antes y después de la unión con la EPO. **A:** En el lado superior izquierdo se representa la estructura cuaternaria del receptor libre. Los dominios D2 se mantienen alejados uno del otro evitando la autofosforilación de las JAK quinasas en la región citoplasmática, como se observa en el esquema inferior. **B:** En el lado derecho se representa la estructura cuaternaria del receptor ligado a la EPO. Se observa en ambos esquemas el cambio de configuración tanto a nivel extracelular como citoplasmático. Imagen modificada de Livnah, 1999.

La alteración de la conformación de los receptores produce un proceso de autofosforilación de la proteína tirosinquinasa de la familia Janus 2 (JAK2, sigla en inglés de *Janus kinase 2 [a protein tyrosine kinase]*) y de fosforilación de tirosinas en el dominio citoplasmático del receptor. Esta etapa genera un sitio de unión específico de proteínas con dominios de unión de tipo SH2, (sigla en inglés de *Src Homology 2 domain*) (Fisher, 2003; Jelkmann, 2004; Koury, 2005; Weiss, 2003).

Varias cascadas de señalización, con efectos anti-apoptóticos, se activan a causa de esta interacción; entre ellas se han descrito:

-Señal de traducción y activación del factor de transcripción 5 (STAT5, sigla en inglés de *Signal Transducer and Activator of Transcription 5*): Factor de transcripción con dominios de unión a regiones de tipo SH2. Produce la activación de numerosos genes en el núcleo, incluyendo inhibidores de la apoptosis como es el caso de Bcl-x (Sasaki *et al*, 2000; Weiss, 2003).

- Factor de transcripción GATA-1 (sigla en inglés de *GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)*): Factor de transcripción que induce la producción de la proteína anti-apoptosis Bcl-x_L (Jelkmann, 2004).

-Fosforilación de la tirosina del producto proteico del proto-oncogen Vav. Activa a la proteína Rac-1, implicada en las fases de proliferación celular y organización del citoesqueleto, además de interactuar con la subunidad reguladora PI-3K/Akt, (fosfatidil inositol quinasa 3 MAP quinasas) (Sasaki *et al*, 2000).

-Activación de enzimas como PI-3K/Akt y proteinasa C quinasa (Koury, 2005; Weiss, 2003)

-Activación de la transcripción de oncogenes de tipo *c-fos* y *c-jun*, mediante complejos de unión (Fisher, 2003).

Se han descrito varias rutas de inhibición del proceso de activación. Una de ellas es la acción de una proteína tirosina fosfatasa, de tipo no receptor, (HCP, sigla en inglés, *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type*). Esta enzima promueve la desfosforilación de JAK2, suprimiendo la cascada de señalización. Se ha observado que la ausencia de los sitios de unión en el receptor de esta proteína por causa de una mutación produce eritrocitosis familiar, caracterizada por una mayor hipersensibilidad a la EPO, un mayor contenido de Hb y un incremento en la capacidad de transporte de O₂ (de la Chapelle A. *et al*, 1993; Kralovics *et al*, 1997; Yoshimura & Arai, 1996).

Otros mecanismos descritos son la presencia de proteínas de unión que interactúan con los dominios tirosina-quinasa de los JAK, ya sea produciendo una reducción marcada en su actividad o produciendo la desactivación del complejo receptor-JAK2 quinasa (Jelkmann, 2004; Sasaki *et al*, 2000).

Por otro lado, se ha propuesto un mecanismo de regulación negativa, mediante la degradación del complejo “receptor-EPO” a través de un proceso de endocitosis (Jelkmann, 2004; Koury, 2005).

Otros mecanismos de acción no hematopoyéticos

Acción neuroprotectora

Modelos *in vivo* e *in vitro* han demostrado la presencia de EPO y de sus receptores en diferentes áreas del sistema nervioso central (neuronas y astrocitos). Se ha comprobado que la EPO posee funciones protectoras a nivel neuronal y vascular, además se ha postulado que puede llegar a tener un papel importante en el desarrollo neuronal durante la gestación (Maiese *et al*, 2005; Sasaki *et al*, 2000). El mecanismo de estimulación parece ser el mismo que se ha establecido para el riñón, es decir, la hipoxia induce la expresión del gen de la EPO a través del sistema de fosforilación JAK2, sin embargo el circuito es totalmente independiente del sistema hematopoyético

y parece estar regulado por el IGF-1 y la insulina (Genc *et al*, 2004; Sasaki *et al*, 2000; Sola *et al*, 2005).

Los mecanismos de acción postulados por los cuales la EPO lleva a cabo su función neuroprotectora consisten en reducir la formación de radicales libres de óxido nítrico y glutamato, estimular la angiogénesis, atenuar la apoptosis, modular la inflamación o activar los canales de calcio (Ca^{2+}) (Buemi *et al*, 2002; Genc *et al*, 2004; Sasaki *et al*, 2000).

Acción angiogénica

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos por la extensión de vasos pre-existentes mediante la degradación de la membrana basal vascular, la proliferación y migración de células endoteliales. Estudios recientes han demostrado la existencia de un receptor para la EPO en células endoteliales del endometrio uterino y la vena umbilical humana (Sasaki *et al*, 2000; Yokomizo *et al*, 2002). Se ha observado que la EPO estimula la migración y proliferación de las células endoteliales. Su papel se ha comparado con el del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, sigla en inglés de *Vascular Endothelial Growth Factor*), el cual está implicado ampliamente en la angiogénesis, en especial en el proceso angiogénico del aparato reproductor femenino (Buemi *et al*, 2002; Sasaki *et al*, 2000). Estudios recientes han evaluado el papel de la EPO en el proceso angiogénico del útero, planteando la existencia de un sistema paracrino de la EPO.

Se ha identificado que ovarios y oviductos producen EPO en ratones (Masuda *et al*, 2000). El incremento de su concentración es suficiente para activar la angiogénesis, estimulando la proliferación y migración de células endoteliales. La producción a diferencia del riñón, hígado y cerebro se encuentra controlada bajo el estímulo del 17- β -estradiol, principal factor de regulación del ciclo de desarrollo uterino (Maiese *et al*, 2005; Masuda *et al*, 2000).

En el caso del sistema reproductor masculino, se ha observado que la EPO estimula la maduración del espermatozoide en el epidídimo de ratas y la producción de testosterona en humanos tras la administración de rEPO. La detección del receptor de la EPO en las células de Leydig, las cuales son las células productoras de testosterona, ha hecho postular la posible implicación de la EPO en la esteroidogénesis testicular (Foresta *et al*, 1994).

Por otro lado, se ha observado que tras la administración de EPO antes o después de una isquemia miocárdica, se produce un aumento en la función cardíaca, una mejora de la contractilidad ventricular, una disminución de la fatiga, un aumento en la capacidad física y la disminución en el periodo de hospitalización. Se postula que los mecanismos por los cuales la EPO mejora la función cardíaca son a través de la generación de nuevos vasos sanguíneos, la proliferación de células cardíacas y la supresión de la apoptosis de las células miocárdicas (Maiese *et al*, 2005) .

METABOLISMO

Pocos son los estudios que se han llevado a cabo en esta área. A partir de la información obtenida de la farmacocinética de la EPO, algunos autores han llegado a desarrollar estudios en los cuales se han planteado posibles rutas metabólicas, sin embargo los datos son escuetos y un mecanismo general aún es difícil de describir.

Se ha estimado que la vida media de la EPO endógena humana es de alrededor 3 horas (Jelkmann, 2002) y su tasa media de eliminación puede llegar a tener un rango de 4 a 11 horas (Kendall, 2001). Se ha postulado que el mecanismo de eliminación es saturable debido a la farmacocinética no lineal de la EPO, es decir, a medida que la dosis de EPO aumenta, la tasa de eliminación plasmática disminuye (Veng-Pedersen *et al*, 2004). Los órganos que pueden estar implicados en el catabolismo de la EPO son el riñón, el hígado y la médula ósea (Jelkmann, 2002). Varias evidencias como la diferencia a nivel estructural de los azúcares entre la EPO sérica (mayor

contenido de isoformas básicas) y la urinaria (mayor contenido de isoformas ácidas) (Skibeli *et al*, 2001; Wide *et al*, 1995), sugieren la existencia de otros tipos de mecanismos, que involucren otros órganos o rutas.

Vías metabólicas que se han descrito hasta la fecha:

1. Degradación de la EPO mediante la unión al receptor: después de la unión al receptor, dos mecanismos pueden suceder, el complejo (receptor-EPO) es degradado por la acción de los lisosomas, una vez éste ha sido introducido en el citoplasma mediante un proceso de endocitosis (40%) ó puede ser re secretada la molécula al exterior de forma intacta (60%). Este proceso es independiente del contenido de ácidos siálicos presentes en la molécula, *v.gr.*: la rEPO *vs.* NESP, presentan la misma tasa de internalización (Constante de internalización del complejo EPO-receptor: $0,06 \text{ min}^{-1}$), a pesar de que el NESP contiene un mayor número de ácidos siálicos (un máximo de 22) (Gross & Lodish, 2006).

Asimismo, se ha observado diferentes tipos de disociación y unión. La rEPO se disocia más lentamente del receptor que NESP, *v.gr.*: A 37 °C, rEPO se disocia en promedio de 24 minutos, mientras NESP se disocia a 17 minutos. Por otro lado, la rEPO es 5 veces más rápida en unirse al receptor que NESP. Como consecuencia más rEPO es degradada (Gross & Lodish, 2006).

2. Degradación vía médula ósea: estudios realizados en ratas y ovejas han demostrado que tras un sangrado continuo seguido de un periodo de irradiación e inactivación de la médula ósea, se produce una reducción en la tasa de eliminación plasmática. Se ha especulado que este efecto es causado por la disminución de células progenitoras portadoras de receptores de EPO como son las células BFU y CFU, donde se puede llevar a cabo la degradación de la EPO mediante el receptor vía endocitosis, como ya se ha explicado anteriormente (Chapel *et al*, 2001; Veng-Pedersen *et al*, 2004).

Se ha descrito que el mecanismo puede no solo estar regulado por la presencia de receptores sino también por la cantidad presente en la

superficie. No es claro cuál pueda ser el papel de los receptores presentes en células no hematopoyéticas, se ha sugerido que tal vez su mecanismo este más localizado a nivel de la inhibición de la apoptosis (Veng-Pedersen *et al*, 2004).

3. Degradación vía hepática: el papel del hígado en la eliminación de la EPO, es secundario. Estudios en animales con la función hepática alterada o donde se ha eliminado parte del hígado han demostrado que la tasa de eliminación de la EPO no es alterada (Jelkmann, 2002). Sin embargo, algunos estudios en ratas han demostrado que la remoción de los ácidos siálicos puede alterar esta tasa, siendo más rápida en este caso ($t_{1/2} = 2$ min) que al utilizar EPO intacta ($t_{1/2} = 180$ min) (Spivak & Hogans, 1989).

Se ha postulado que la EPO puede perder los ácidos siálicos por la acción de sialidasas tisulares o sanguíneas ocasionando la exposición de los residuos de galactosa (Fukuda *et al*, 1989; Spivak & Hogans, 1989). Las moléculas de EPO que exponen estos residuos son eliminadas en los hepatocitos mediante una lectina de unión a asialoglicoproteínas, como se ha explicado anteriormente (Takeuchi *et al*, 1990; Wasley *et al*, 1991).

La tasa de eliminación puede verse afectada por la presencia de repeticiones de tipo *N*-acetil-lactosamina en las cadenas de azúcares. En el caso de presentar más de 3 repeticiones de este tipo en una misma molécula y aún en presencia de ácido siálico, se produce un aumento en el proceso de degradación a través de los receptores hepáticos (Fukuda *et al*, 1989). Alternativamente, se ha descrito un incremento en la eliminación de EPO por esta vía tras la administración de dosis repetidas de EPO (Kato M *et al*, 1999). Se cree que puede ser ocasionado por un proceso de regulación por aumento (o *upregulation*), entre la médula ósea y el hígado; donde se produce una migración de las células BFU desde la médula ósea al hígado, después de la administración de EPO. Finalmente estas células se transformarán al estadio CFU, exponiendo un mayor número de receptores y un aumento en la rata de eliminación de la EPO (Kato M *et al*, 1999).

4. Degradación vía renal: el riñón es otro de los sitios secundarios donde se produce la degradación de la EPO. Este órgano puede llegar a eliminar en la orina un 10% del total de la EPO y algunos productos de degradación (Kendall, 2001).

Se cree que los factores limitantes de este proceso dependen de todas aquellas variables que afecte el proceso de filtración glomerular, por ejemplo, las propiedades físico-químicas del compuesto; en el caso de la EPO, el tipo de carga y el tamaño. Se ha observado que la EPO con cadenas de tipo biantenarias son filtradas rápidamente por el glomérulo en comparación con la rEPO con cadenas superiores (Misaizu *et al*, 1995), adicionalmente la eliminación de las cadenas tipo N producen un aceleramiento en la tasa de filtración y eliminación en la orina (Fukuda *et al*, 1989).

CONCENTRACIONES DE EPO

Actualmente, la concentración de EPO es determinada mediante el uso de ensayos inmunológicos, los valores son expresados en unidades internacionales (IU, sigla en inglés de *International Unit*) por litro (IU/L ó mIU/ml).

La unidad fue definida en base a la actividad biológica determinada mediante ensayos *in vivo*. Se estableció que una unidad corresponde a la cantidad de EPO que posee la capacidad de estimular la eritropoyesis de igual manera a la que produce 5 μM de Co^{2+} (White *et al*, 1960)

Para la determinación de la concentración de EPO, los ensayos inmunológicos utilizan patrones de concentración conocida, que han sido calibrados frente a un estándar de referencia (Marsden, 2006). Existen varios estándares de referencia, el primer estándar se produjo en 1961 a partir de plasma de oveja (Standard A, 23 U/mg). En 1966 fue obtenido el primer estándar de referencia a partir de orina humana, "Standard B", el cual contenía 10 IU por ampolla (Cotes & Bangham, 1966). En 1972 fue

reemplazado por la preparación de referencia de EPO (NIBSC 67/343) producida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el laboratorio responsable de preparación de estándares “NIBSC” (*National Institute for Biological Standards and Control*). Esta preparación fue obtenida a partir orina humana procedente de individuos con anemia, aproximadamente contiene 2 mg de un extracto de orina con una actividad de 10 IU (Annable *et al*, 1972).

A partir 1991 estuvo disponible el primer estándar internacional de rEPO (NIBSC 87/684), cada ampolla de esta preparación presenta una actividad de 86 IU (Storring & Gaines Das, 1992). Estos dos últimos estándares de referencia son los más utilizados actualmente en la calibración de patrones de referencia de los diferentes ensayos cuantitativos (ver Tabla 3).

Debido a que estos dos últimos materiales de referencia presentan diferencias ocasionadas por el tipo de célula empleada para sintetizar EPO, los métodos de purificación empleados y las variaciones interlote, hace que la determinación de las concentraciones de EPO dependan en suma medida del ensayo o kit comercial utilizado (Marsden, 2006; Storring & Gaines Das, 1992).

Tabla 3: Ensayos inmunológicos comerciales para la medición de EPO.

Distribuidor	Ensayo comercial	Método	Estándar de referencia
Nichols Institute	Nichols	QUIO*	87/684
Diagnostic Products Corporation	Immulite	QUIO	67/343
	Immulite 2000	QUIO	67/343
R&D Systems	Quantikine EPO	ELISA**	67/343
Cambridge life sciences	Biomerica EPO	ELISA	87/684
IDS Ltd	EPO ELISA	ELISA	67/343
Diasorin Ltd	EPO-Trac	RIA***	67/343
Beckman Coulter Inc	Access EPO	QUIO	67/343

QUIO*: Inmunoensayo quimioluminiscente, ELISA**: Enzyme Linked Immuno Assay; RIA***, Radioinmunoensayo.

Cabe resaltar en este apartado, que las unidades internacionales son una medida arbitraria que se han utilizado ampliamente en el entorno clínico y que no incluye las variaciones dadas por las diferentes actividades que puede presentar las diversas moléculas de EPO (Storring & Gaines Das, 1992). Una aproximación real a la estimación de las concentraciones de EPO puede realizarse utilizando como unidad de medida la actividad específica, *v.gr.*: La solución de referencia producida por la farmacopea europea contiene 250 µg de rEPO con una actividad de 32500 IU, la relación masa activa de 1 IU de rEPO corresponde a 7,7 ng (Behr-Gross *et al*, 2004), mientras que la solución de referencia NIBSC 87/684, tiene una actividad específica de 8.0 ng por 1 IU de rEPO (Storring & Gaines Das, 1992).

Debido a que la unidad es expresada según la actividad biológica, diferentes productos pueden presentar diferentes actividades, en dependencia de su estructura de azúcares (Storring & Gaines Das, 1992). Algunos autores han tomado un valor promedio y han llegado a definir que una unidad de EPO corresponde a 10 ng (Lasne *et al*, 2002).

Concentraciones de EPO bajo condiciones fisiológicas

El rango de referencia de las concentraciones de EPO sérica en individuos sanos se ha descrito se encuentra entre 5-25 IU/L (1-2 pM/L), con una media alrededor de 15 IU/L y unos límites de confianza del 95% entre 10 y 30 IU/L (Kendall, 2001; Marsden, 2006; Sherwood & Goldwasser, 1979).

No se han descrito diferencias ocasionadas por la raza, género y ciclo menstrual, pero si se ha reportado variaciones inter-individuales tanto en condiciones normales, de hipoxia o cambios de altitud (Klausen *et al*, 1996). Se han descrito concentraciones elevadas durante el embarazo y el caso contrario en recién nacidos y prematuros, los cuales después del tercer mes de edad alcanzan los valores normales (Kendall, 2001; Marsden, 2006).

Adicionalmente, la hormona está sujeta a un ciclo circadiano, en donde las máximas concentraciones se observan en la tarde y las bajas a primeras horas de la mañana. El ciclo no varía con la edad, la actividad física o la

altitud (Ershler *et al*, 2005; Grunenfelder, 1996; Klausen *et al*, 1996; Pasqualetti & Casale, 1997; Wide *et al*, 1989).

Aunque los ensayos utilizados para la determinación de EPO han sido diseñados para la cuantificación de EPO en suero o plasma, también se han utilizado para la cuantificación de EPO en orina. La cantidad de uEPO excretada en la orina es mínima y es necesario concentrar para poder cuantificar. Se ha descrito que en la orina de sujetos sanos, los valores de uEPO pueden estar alrededor de una media de 1.5 UI/L y un rango entre 0,5-3 IU/L (Lasne *et al*, 2002; Souillard *et al*, 1996; Wide *et al*, 1995).

Concentraciones de EPO bajo condiciones patológicas

Como se ha descrito anteriormente, el principal estímulo para la producción de EPO es la hipoxia. Los niveles de EPO son constantes cuando la Hb se halla en niveles normales, si estos niveles descienden por debajo de 10 g/dl, las concentraciones de EPO se elevan exponencialmente, *v.gr.* en el caso de una hemorragia, la hipoxia tisular induce un aumento en la síntesis de EPO que conduce a la formación de hematíes del doble al triple en un plazo de 7 a 10 días.

En situaciones patológicas la concentración de EPO sérica se puede encontrar elevada en las siguientes condiciones: tras un trasplante, anemia aplásica, anemia por deficiencia de Fe, algunas anemias megaloblásticas, talasemia, síndromes mielodisplásicos y algunos tipos de tumores como carcinomas renales. Mientras que concentraciones bajas se observan en la anemia por insuficiencia renal crónica, anemia por cáncer, anemias por infecciones crónicas, SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida), anemia por malnutrición, anemia por hipotiroidismo, artritis reumatoide, entre otras. (Kendall, 2001).

Los factores séricos de la EPO no solo están influenciados por la severidad de la anemia o hipoxia, sino por otros factores como la masa medular eritroide y los niveles de interleucinas como IL-1 o TNF.

CAPÍTULO 2

ERITROPOYETINA RECOMBINANTE

La clonación y expresión del gen de la EPO humana permitió la obtención de rEPO como preparación farmacéutica. Se han utilizado diferentes líneas celulares para la obtención de rEPO, entre ellas se han descrito: células de riñón de crías de hámster (BHK, sigla en inglés de *Baby Hamster Kidney*), células de ovario de hámster de origen chino (CHO, sigla en inglés de *Chinese Hamster Ovary*), células HeLa (línea celular inmortal de células de cáncer cervical procedentes de la paciente Henrietta Lacks), línea celular de fibroblasto murino C127, células epiteliales mamarias de origen murino, líneas celulares de origen linfoide, células ψ 2 derivadas a partir de la línea celular NIH/3T3, células de insectos y células de tabaco entre otras (Cointe *et al*, 2000; Matsumoto *et al*, 1995; Takeuchi & Kobata, 1991; Toledo *et al*, 2005; Wide *et al*, 1995; Wojchowski *et al*, 1987).

Todas estas preparaciones se caracterizan por tener en común la misma cadena peptídica pero diferente patrón de glicosilación. Como ya se ha explicado anteriormente, esta variación es producto del uso de diferentes sistemas celulares, condiciones de cultivo y procesos de purificación.

La nomenclatura utilizada para la denominación de los diferentes productos de rEPO sigue las normas establecidas por la OMS. Todos los productos con la misma cadena de aminoácidos se denominan con el mismo prefijo, “epoetin”, en caso de variaciones a este nivel debe utilizarse otro prefijo diferente como por ejemplo el utilizado en el caso del análogo de EPO, darbepoetin. Después del prefijo se utiliza una letra del alfabeto griego para denominar los diferentes patrones de glicosilación, por ejemplo, epoetin alfa, beta, omega, etc (World Health Organization, 2006).

Actualmente son reconocidos por la OMS las siguientes denominaciones comunes internacionales para las sustancias farmacéuticas o INNs (sigla en inglés de *International Nonproprietary Names*) de rEPO: epoetin alfa, epoetin beta, epoetin gama, epoetin épsilon, epoetin omega, epoetin zeta, epoetin theta, epoetin iota y epoetin delta (World Health Organization, 2005; World Health Organization, 2006), ver tabla 4.

Tabla 4: Ejemplos de preparaciones farmacéuticas internacionales de de rEPO aceptadas por la OMS.

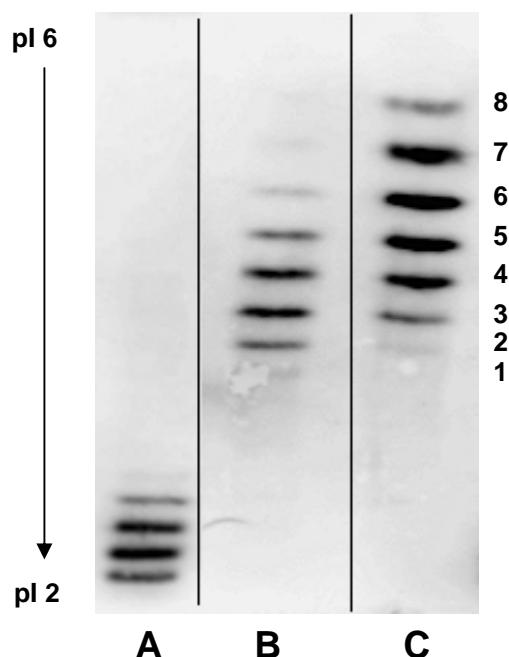
INNs	ORIGEN	DENOMINACION COMERCIAL
Epoetin alfa	Células CHO	Epoade [®] , Epogen [®] , Epopen [®] , Epoxitin [®] , Eprex [®] , Erypo [®] , Espo [®] , Globuren [®] , Procrit [®]
Epoetin beta	Células CHO	Epoch [®] , Eritrogen [®] , Neorecormon [®] , Epogin [®] , Erantin [®] , Marogen [®] , Recormon [®]
Epoetin omega	Células BHK	Epomax [®] , Hemax [®]
Epoetin delta	Línea celular humana	Dynepo [®]
Epoetin épsilon	Células BHK	No comercializada
Epoetin zeta	Línea celular humana	Inicio de comercialización en 2008

PROPIEDADES QUÍMICAS DE LA EPO RECOMBINANTE

Se ha demostrado que según la estructura de los azúcares varían las propiedades biológicas, físico-químicas como inmunológicas (Storring *et al*, 1996; Storring & Gaines Das, 1992; Wide & Bengtsson, 1990).

Como se ha descrito en el capítulo anterior de acuerdo a la estructura de los azúcares y en particular al contenido de ácido siálicos tanto el pl como el peso molecular pueden variar. En el caso de las preparaciones farmacéuticas estas propiedades varían de acuerdo a los procesos de purificación que seleccionan isoformas que aumentan la actividad biológica y la vida media de la molécula. El producto final se caracteriza por un conjunto de isoformas que presenta una distribución característica (ver figura 8).

Figura 8: Perfiles de isoformas de diferentes rEPO tras la aplicación de la técnica de isoelectroenfoque, en un gel con un rango de pH de 2 a 6. **A:** NESP, **B:** rEPO alfa+beta y **C:** rEPO omega.



En el caso de rEPO alfa, beta y omega las isoformas se distribuyen en un rango de pH entre 4,4 y 5,2, se diferencian por el número de isoformas y la cantidad de ácidos siálicos que componen las cadenas de azúcares. Esta última variable determinará el salto a una isoforma. Las variaciones a nivel de PM solo se podrán determinar mediante técnicas muy sensibles que puedan medir las diferencias a nivel de un ácido siálico (291 Da) dentro de todo el conjunto de ácidos siálicos que componen la isoforma, como de todas las isoformas que componen la molécula.

Tabla 5: Propiedades químicas de rEPO alfa, beta, omega y NESP.

Propiedad química	rEPO alfa	rEPO beta	rEPO omega	NESP
Peso molecular	29,8±0,3 KDa	29,8±0,3 kDa	≈35 kDa	36,8±0,4 kDa
Número de isoformas	5-6	7-8	7-8	5-6
Rango de pI	4,4-5,2	4,4-5,2	4,2-4,3	3,0-3,9
Cantidad de cadenas glicosiladas	3	3	3	5

Cadenas de azúcares: rEPO

Son numerosas las investigaciones que se han realizado a nivel de la estructura de los azúcares presentes en las diferentes preparaciones de rEPO. Las estructuras encontradas dependen del tipo de célula donde se han obtenido, en este capítulo se describirá las estructuras observadas en los sistemas celulares más estudiados para la obtención de rEPO: células CHO y BHK.

Las estructuras de azúcares que componen las cadenas N-glicosídicas tanto en la rEPO alfa, beta y omega son similares en los patrones de las ramas. Se observan patrones de tipo tetra, tri y biantenarias en las cadenas de tipo *N*-acetil-lactosamina (Kamerling, 1996), aunque en el caso de la rEPO omega la presencia de cadenas de tipo tri y biantenarias, es escasa (Nimtz *et al*, 1993).

En la posición Asn24 se detectan estructuras di, tri y tetraantenarias en el caso de rEPO alfa y rEPO beta. Sin embargo, en estas últimas puede haber cadenas híbridas. En las posiciones Asn38 y Asn83 contienen cadenas triantenarias y tetraantenarias, siendo estas últimas las predominantes (Kamerling, 1996; Nimtz *et al*, 1993; Rush *et al*, 1995). El patrón de glicosilación de rEPO omega se caracteriza por presentar en la posición Asn24 cadenas del tipo di, tri, tetraantenarias y cadenas híbridas, mientras en las posiciones Asn38 y Asn83 son casi exclusivamente de tipo tetraantenaria (Kamerling, 1996).

En la rEPO (alfa, beta o omega) se observa que la mayoría de cadenas son tetraantenarias fucosiladas con 0 a 3 repeticiones de Gal β 1-4GlcNAc β 1-3 (*N*-acetil-lactosamina) y pueden estar total o parcialmente sialiladas (Kamerling, 1996; Takeuchi & Kobata, 1991; Yuen *et al*, 2003). Estas repeticiones también se pueden observar en cadenas tri- o biantenarias parcial o completamente sialiladas, unidas mayoritariamente al carbono 6 y 2 de los residuos Man (Hokke *et al*, 1995; Sasaki *et al*, 1987). Las cantidades relativas pueden variar entre lotes. Sin embargo, varios estudios indican que la

cantidad presente de estas estructuras son más abundantes que en la uEPO (Choi *et al*, 1996; Kamerling, 1996; Takeuchi & Kobata, 1991; Yuen *et al*, 2003).

Otras estructuras se han detectado de forma ocasional, como es el caso de cadenas tetraantenarias con un máximo de 3 repeticiones del tipo: Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)Man(α 1-3) o Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-2)Man α 1-3 (Kamerling, 1996; Nimtz *et al*, 1993b; Takeuchi *et al*, 1989) o cadenas tri y biantenarias con repeticiones del tipo Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-3)Gal(β 1-4)GlcNAc(β 1-4)Man α 1-3 (Kamerling, 1996; Nimtz *et al*, 1993; Sasaki *et al*, 1987).

Se ha demostrado que la unión entre el ácido siálico y la galactosa en las cadenas N-glicosídicas es del tipo α 2-3 exclusivamente. El 95% son de tipo Neu5Ac pero también se han observado otros tipos como son: Neu5Gc (\approx 1-3%) y Neu5,9Ac₂ (3-15%) (Hokke *et al*, 1990; Linsley *et al*, 1994; Rush *et al*, 1995; Sasaki *et al*, 1987; Yuen *et al*, 2003). En el caso de la rEPO omega, la proporción del contenido de Neu5Gc, puede ser menor en comparación con la observada en la rEPO alfa o beta (Nimtz *et al*, 1993e). Se ha postulado que la presencia de Neu5,9Ac₂ está relacionada con la disminución o inhibición del proceso de desialización al impedir la acción de las neuraminidasas en parte responsables del metabolismo de la glicoproteína en el hígado (Rush *et al*, 1995).

La presencia de otros residuos como sulfatos o fosfatos ha sido descrita en rEPO omega, al observar estructuras de oligomanosa fucosiladas, que presentan una masa adicional de 80 Da (Ohta *et al*, 2002; Yuen *et al*, 2003). Se ha observado la presencia de cadenas tetraantenarias sulfatadas, donde se ha descrito que el grupo sulfato puede estar ubicado en la parte terminal, unido a una GlcNAc y localizándose en el residuo GlcNAc-7 de la estructura GlcNAc β 1-4Man α 1-3 (Kawasaki *et al*, 2001).

En el caso de las cadenas O-glicosídicas se ha observado que están compuestas mayoritariamente por estructuras del tipo Neu5Ac(α 2-3)Gal β 1-3GalNAc y Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3 (Neu5Ac α 2-6), que pueden llegar a estar desialiladas. Otras estructuras como disacáridos de Neu5Ac α 2-6GalNAc y sus formas desialiladas, han sido descritas (Hokke *et al*, 1995; Linsley *et al*, 1994; Ohta *et al*, 2002). En el caso de la rEPO omega, la glicosilación de de las cadenas O-glicosídicas solo es del 60% (Deicher & Horl, 2004).

UTILIZACION TERAPEUTICA

Antes de la obtención de rEPO, el tratamiento disponible para la anemia ocasionada por insuficiencia renal crónica consistía en transfusiones regulares de sangre. En 1986 se demostró la eficacia de la rEPO en el tratamiento de anemia asociada a estados finales de falla renal. Tres años después fue aprobado su uso y se inicio un cambio en los protocolos de tratamiento de las anemias ocasionadas por falla renal (Eschbach *et al*, 1987; Macdougall *et al*, 1990; Winearls *et al*, 1986).

Actualmente, la rEPO es el tratamiento estándar para las anemias de origen renal (falla renal crónica y aguda) y algunas de origen no renal como por ejemplo las anemias asociadas a cáncer (ocasionadas por la quimioterapia), hemoglobinopatías, mieloma, síndromes mielodisplásicos, aplasia, enfermedades autoinmunitarias (artritis reumatoide), SIDA, etc. Otras aplicaciones están relacionadas en los casos de autotransfusiones y de trasplante (Marsden, 2006).

La corrección de la anemia lleva a una mejora en la calidad de vida, en la función cardíaca y cognitiva como en la mejora en la capacidad al ejercicio. Sin embargo, no todos los pacientes tienen la misma respuesta a la terapia, esta puede fallar en dependencia a situaciones como deficiencia de Fe, infecciones o estados de inflamación, hiperparatiroidismo o osteítis fibrosa (Jelkmann, 2004; Kendall, 2001).

El uso de rEPO puede llegar a causar algunos efectos secundarios, como hipertensión que puede llevar a encefalopatía y convulsiones, trombosis y reacciones alérgicas. Algunos estudios también han reportado la producción de anticuerpos anti-EPO que pueden llegar a ser causantes de la falla en la terapia con rEPO (Casadevall, 2002; Casadevall *et al*, 2002).

Otras aplicaciones están siendo desarrolladas en paralelo de acuerdo a los últimos hallazgos a nivel de los mecanismos de acción no hematopoyéticos (neuronal y/o angiogénica) de la rEPO y de la presencia de receptores de EPO en otras células, como ya se ha descrito anteriormente.

FARMACOCINÉTICA

En general la mayoría de estudios publicados de farmacocinética se han llevado a cabo en rEPO alfa y beta mientras que en el caso de los otros tipos de rEPO son escasos los datos reportados. Este capítulo se centrará en describir la farmacocinética descrita para la rEPO producida en células CHO.

La mayoría de estudios se han llevado a cabo en voluntarios sanos y pacientes con patologías a nivel renal como la falla renal crónica o pacientes con daño renal sujetos a diálisis, hemodiálisis o diálisis peritoneal intermitente (Macdougall *et al*, 1991).

La rEPO se caracteriza por presentar un patrón de eliminación de tipo bi-exponencial, en el cual se observa una primera fase rápida de desaparición seguida por una fase de eliminación prolongada (Kryzanski *et al*, 2005). Este mecanismo es reconocido claramente a bajas dosis mientras a concentraciones elevadas se pierde sugiriendo una farmacocinética no lineal que indica un mecanismo de eliminación saturable.

La respuesta tras la administración se caracteriza por un suave incremento en los niveles de Hb (alrededor de un 9,6%), Hcto (alrededor de un 8,3%), reticulocitos, macrocitos, niveles de EPO sérica y el factor soluble de

transferrina (sTR), los valores pueden llegar a ser significativos del 3 al 10 día tras la administración. Esta respuesta suele estar acompañada por un sistema de retroalimentación transitorio en el cual la producción de EPO endógena es suprimida temporalmente, llegando incluso a observarse niveles por debajo de los basales antes de alcanzar la normalidad (Lippi *et al*, 2006).

Clínicamente los pacientes que reciben rEPO aumentan la capacidad de toma de oxígeno, lo que conlleva a una mejora en el desarrollo de las actividades diarias y del ejercicio, estudios recientes han demostrado como el aumento de los niveles de Hb en pacientes anémicos con tumores y la calidad de vida están correlacionados de modo positivo (Lippi *et al*, 2006; Weiss, 2003). Sin embargo la respuesta tras la administración dependerá de la dosis, esquemas de administración (frecuencia de las dosis, duración del tratamiento) y rutas de administración (Breymann, 2000).

Rutas de administración

Vía Intravenosa

Se caracteriza por presentar un pico alto en la concentración plasmática tras la administración que decae rápidamente de forma mono-exponencial, con una vida media de 4 a 12 horas tras la administración de una única dosis y de 6 horas tras la administración de varias dosis (Breymann, 2000; Macdougall *et al*, 1991).

El volumen de distribución es comparable al del plasma (Macdougall *et al*, 1989; Macdougall *et al*, 1991), aunque algunos estudios han llegado a reportar que puede llegar a ser 1,5 veces mayor (Kindler *et al*, 1989). La concentración de la EPO vuelve a su nivel basal entre el 2 y 3 día después de la administración.

Estudios en individuos sanos tras múltiples administraciones han demostrado que la eliminación es no-lineal a bajas dosis mientras a altas dosis la

eliminación puede llegar a depender de la dosis (Krzyzanski *et al*, 2005b; Ramakrishnan *et al*, 2004). Estos datos han llegado a sugerir que los receptores de la EPO ubicados en la médula ósea son saturables y/o su capacidad de unión a la EPO es baja, esta última puede llegar a ser una explicación al mecanismo de eliminación lineal que se produce tras la administración a altas dosis (Krzyzanski *et al*, 2005).

Vía Subcutánea

Después de la administración subcutánea se observa un pico máximo en la concentración de rEPO a las 14-18 horas, que es obviamente muy inferior a los niveles de rEPO alcanzados con la misma dosis por vía intravenosa (Breymann, 2000; Kampf *et al*, 1989; Neumayer *et al*, 1989).

La biodisponibilidad es del 20-40%. Se cree que este valor puede estar afectado por el tamaño de la molécula y por la acción de peptidasas en la piel que puedan degradar la rEPO (Kampf *et al*, 1989; Macdougall *et al*, 1989).

La mayor parte de la rEPO biodisponible es absorbida entre el 2 y 3 día, caracterizándose por un proceso de absorción prolongado que consta de dos etapas, una rápida y otra lenta. La primera etapa puede ser causada por una pérdida a nivel de los vasos sanguíneos locales, mientras la segunda etapa puede ser causada por una entrada lenta en la vía linfática (Krzyzanski *et al*, 2005; Ramakrishnan *et al*, 2004). Los mecanismos de reabsorción llevan a un *plateau* en los niveles de la concentración superior al observado a las 24 horas de una administración intravenosa indicando una eliminación más prolongada (Cheung *et al*, 1998; Kampf *et al*, 1989).

La farmacocinética parece ser lineal a dosis entre 50-1000 UI/kg pero a dosis bajas (10 UI/kg) se ha observado puede ser no lineal (Lippi *et al*, 2006). La concentración sérica puede llegar a ser detectable 4 días después de la administración y los niveles regresan a sus valores basales al día 15. En el caso de una sola dosis los reticulocitos incrementan al segundo día,

manteniéndose a lo largo de 10-14 día y luego decaen entre el día 22 a 24, mientras que bajo esquemas repetidos de administración estos pueden continuar elevados después de este día (Cheung *et al*, 1998; Macdougall *et al*, 1989; Souillard *et al*, 1996).

El tiempo de persistencia y los valores en la concentración plasmática de EPO hacen de esta vía la más óptima, en función de alcanzar una respuesta capaz de mantener los niveles de EPO de manera moderada y constante (Neumayer *et al*, 1989).

Debido a la farmacocinética que presenta esta vía es una de las más utilizadas actualmente a nivel clínico y se cree que por la misma razón es la vía más utilizada en el deporte. Estudios en atletas han demostrado que la farmacocinética es similar a la descrita anteriormente en sujetos sanos o enfermos; solo en el caso de la tasa de eliminación se ha observado que es 3-5 veces mayor que en sujetos no entrenados (6,5 ml/h/kg) (Lippi *et al*, 2006; Souillard *et al*, 1996).

Vía Intraperitoneal

Estudios en animales han demostrado que la EPO puede ser absorbida un 60% en la cavidad peritoneal a través de un dializado o hasta un 98% cuando se aplica directamente en la cavidad. Los estudios en humanos han descrito una farmacocinética que se caracteriza por presentar una muy baja biodisponibilidad (2,5-8,5%), un pico máximo a las 12 horas después de haber pasado el dializado con EPO y una tasa de lenta de eliminación (Macdougall *et al*, 1989; Macdougall *et al*, 1991).

Son pocos los estudios publicados que describen o evalúan esta vía, varios de ellos sugieren un mayor estudio a nivel de la absorción de la EPO y de las complicaciones clínicas asociadas a la ruta de administración como un aumento en el riesgo de peritonitis (Kausz *et al*, 1999; Schroder *et al*, 2001).

La mayoría de estudios se han realizado en niños con anemia renal tratados continuamente con diálisis intraperitoneal donde esta vía puede ser una opción a la vía subcutánea que es incómoda y dolorosa en este tipo de población. Los datos publicados sugieren que la utilización de bolsas pequeñas, volumen de dializados pequeños (50 ml) y diferentes esquemas de dosis repetitivas pueden llegar a producir una respuesta similar a la observada en la administración subcutánea (Kausz *et al*, 1999; Reddingius *et al*, 1994; Reddingius *et al*, 1997).

CAPÍTULO 3

ERITROPOYETINA RECOMBIANTE EN EL DEPORTE

Como se ha descrito anteriormente el estímulo primario para la producción de EPO es la cantidad de oxígeno disponible en la sangre. La producción de EPO tras la activación del gen, permite que ocurra la activación de las células precursoras responsables de la producción de glóbulos rojos en la médula ósea. Este mecanismo puede estar alterado causando diversas patologías; que pueden ser tratadas mediante la administración de rEPO. La obtención de rEPO ha permitido iniciar una nueva era en el tratamiento de enfermedades con productos recombinantes, como se ha explicado ampliamente en capítulos anteriores. Sin embargo, la utilidad de la rEPO no solo ha radicado a nivel terapéutico. Bajo condiciones normales este sistema puede ser un excelente mecanismo de compensación ante los diferentes tipos de respuestas que se producen en condiciones de hipoxia aguda o crónica, como por ejemplo las observadas al realizar cambios de desplazamiento a diferentes altitudes, en la aviación aérea y espacial, la práctica de esfuerzo en altitud o las observadas en relación a ejercicios de larga o corta duración (López Calbet, 2006).

Esta última aplicación ha tenido un alto impacto en el campo del deporte. La capacidad de aumentar la concentración de células rojas en deportes como el ciclismo, el atletismo, el esquí de fondo, etc., con el objetivo de obtener un incremento en la resistencia y el rendimiento ha atraído a muchos deportistas a utilizar diferentes metodologías como el entrenamiento a altas altitudes o en cámara hipobárica, el uso de transfusiones sanguíneas de hematíes (o dopaje sanguíneo) o el uso de rEPO y/o análogos de esta sustancia. Estas dos últimas hacen parte del grave problema del dopaje en el deporte.

ANTECEDENTES HISTORICOS: ERITROPOYESIS VS DOPAJE

La respuesta aguda o crónica a situaciones de hipoxia y su relación con el deporte suscitó gran interés por primera vez en las Olimpiadas realizadas en la ciudad de México en 1968. Debido a la situación geográfica de la ciudad de México, ubicada entre 2240 y 3700 m sobre el nivel del mar, generó un gran debate en la comunidad científica acerca de la respuesta de los deportistas a la falta de oxígeno y de los riesgos que podían producir la práctica de esfuerzo en altitud o condiciones de hipoxia (López Calbet, 2006; Sytkowski, 2004).

A partir de los años 60, son varios los estudios que se citan en la literatura en relación a la respuesta del ser humano a los cambios de altitud. Los estudios realizados en deportistas, sugirieron que pueden ser un mecanismo útil para modificar el rendimiento en dependencia a los esquemas de entrenamiento utilizados (Berglund *et al*, 1988; Berglund, 1992; De, V *et al*, 1988).

Las dos siguientes décadas a los Juegos Olímpicos de México se caracterizaron por el uso de transfusiones sanguíneas o doping sanguíneo. El primer estudio científico que demuestra el uso de transfusiones sanguíneas como mecanismo efectivo para incrementar la capacidad de transporte de oxígeno a la sangre fue reportado en 1947 (Pace, 1947). Las primeras observaciones de doping sanguíneo se citan alrededor de 1976 en los Juegos Olímpicos de Montreal, sin embargo, los primeros casos documentados son en los Juegos Olímpicos de Moscú (1980) y de Los Ángeles (1984). En los juegos de 1980 uno de los corredores (que había obtenido medallas en las carreras de 5 y 10 km) admitió haber sido transfundido horas antes de la competición, mientras que en los juegos de 1984 se logró comprobar que 7 ciclistas del equipo americano, entre ellos Alexis Grewal (medalla de oro) habían sido transfundidos horas antes de la competición (Lippi & Banfi, 2006; Sytkowski, 2004).

El COI (Comité Olímpico Internacional) anunció este caso justo después de haber incluido esta práctica dentro de la lista de sustancias y métodos prohibidos en 1985. La aparición y comercialización de la rEPO en 1987 sustituyó inicialmente las transfusiones sanguíneas, debido a las ventajas

que presentaba: mayor efecto en el rendimiento, menos riesgos a nivel de infecciones, fácil administración y en ese momento, imposible detección (Lippi *et al*, 2006).

Los primeros casos atribuidos al uso de rEPO en deportistas se citan entre 1987 y 1990 (Abbott, 2000). La muerte de varios deportistas y especialmente la de 17 ciclistas profesionales de nacionalidad alemana y belga, mientras dormían, fueron relacionadas con el uso de rEPO. Según los expertos, la muerte pudo ser causada por un aumento en la viscosidad de la sangre ocasionada por la administración continua de rEPO (Gareau *et al*, 1996).

Las dificultades de la época para detectar el uso de rEPO condujeron a las autoridades a evaluar el Hcto de los deportistas antes de la competición, con el objetivo de impedir empezar una prueba con un Hcto que pudiera llegar a ser perjudicial para su salud y no como control antidopaje. El primer control se llevo a cabo en 1980, en el campeonato mundial de carrera a campo traviesa en esquí en Finlandia. Ocho años después, la Federación Internacional de Esquí (FIS, sigla en francés de *Fédération Internationale de Ski*) clasifica la rEPO como una sustancia dopante y solo hasta 1989 el COI incluye una nueva clase de sustancias dopantes, denominada hormonas péptidicas y análogos, donde se incluye la rEPO y sus análogos (Wide *et al*, 1995).

En 1993-1994 la Federación Internacional de Atletismo (IAAF, sigla en inglés de *International Association of Athletics Federations*), introduce controles de sangre. Igualmente, la Unión Ciclista Internacional (UCI, sigla en francés de *Union Cycliste Internationale*) y la FIS aceptan la realización de exámenes de sangre aleatorios antes de la competición en el año 1997. La UCI decide establecer como límites el valor del Hcto de 50% para hombres y de 47% para mujeres, mientras la FIS usa el valor de la Hb utilizando como límite 175 g/l para hombres y 155 g/l para mujeres (Audran *et al*, 1999; Pérez Ruiz, 2006).

Casi una década después de incluir la rEPO en la lista de sustancias prohibidas, otro escandaloso evento en relación con el uso indebido de rEPO fue descubierto en el Tour de Francia de 1998 que paso a la historia como el *Tour of Shame*. El caso del equipo de ciclismo Festina, puso de manifiesto la magnitud del problema. Uno de los miembros del equipo fue arrestado por poseer todo tipo de sustancias dopantes entre ellas, rEPO, hormona del crecimiento, testosterona, anfetaminas, etc. Al mismo tiempo la policía francesa encontró sustancias dopantes en las habitaciones de hotel del equipo alemán "TVM". Muchos equipos abandonaron el tour y solo 96 ciclistas terminaron la competición de los 198 iniciales. Las investigaciones siguientes demostraron que el director y el grupo médico del equipo Festina tenían organizada toda una red de dopaje (Sytkowski, 2004).

En el año 2000, dos estudios con diferentes estrategias para determinar el uso indebido de rEPO son publicados. Uno de ellos consiste en la detección indirecta de rEPO mediante la medición de diferentes parámetros hematológicos que se pueden alterar tras la administración de rEPO (Parisotto *et al*, 2000) y el otro consiste en la detección directa de EPO en la orina. Este último utilizó muestras congeladas del Tour de Francia de 1998, detectando rEPO en 14 muestras (Lasne & de Ceauriz, 2000). Ambos métodos fueron utilizados en los Juegos Olímpicos de Sídney (2000) y los juegos de invierno en Salt Lake City (2002), en estos últimos se detecto por primera vez el uso indebido de NESP en la orinas de Johann Muehlegg, Olga Danilova y Larissa Lazutina (Court of Arbitration for Sports, 2003; International Olympic Committee, 2005; Kazlauskas *et al*, 2002; Sytkowski, 2004).

A pesar de estas nuevas metodologías son numerosos los escándalos publicados en la prensa que hacen referencia al uso indebido de rEPO en el deporte, ya sea por detección en muestras de control antidopaje, por declaraciones realizadas por los deportistas como por ejemplo los casos de los corredores Philippe Gaumont, David Millar y del ciclista Jesús Manzano ó por investigaciones policiales como la Operación Puerto llevada a cabo en

España, que ha vinculado a numerosos deportistas entre ellos algunos ciclistas del *Tour* de Francia del 2006.

Actualmente la lucha contra el dopaje es llevada a cabo por la Agencia Mundial Antidopaje (AMA o WADA, sigla en inglés de *World Anti-doping Agency*) y las legislaciones particulares de cada país. A continuación se explica de forma general como se lleva a cabo la lucha contra el dopaje y que involucra esta actividad.

DOPAJE Y ORGANISMOS REGULADORES

El uso de sustancias o medicamentos para aumentar la capacidad y desempeño de los atletas en el deporte es conocido como dopaje o *doping*. Los orígenes del *doping* se remontan a diversas culturas y situaciones, por ejemplo las antiguas Olimpiadas donde se ha descrito que los atletas consumían infusiones de extractos de plantas. Los atletas tramposos eran condenados a pagar una multa, el dinero era destinado a elaborar estatuas de Zeus, llamadas Zanes, estas eran colocadas a lo largo del camino que conducía al estadio, en ellas se inscribía el nombre del deportista tramposo. Todos los atletas debían pasar por este corredor antes de la competición (International Olympic Committee, 2007).

En la era moderna la lucha contra el dopaje se cita en 1963 cuando el Consejo Europeo, compuesto por 21 países de la Europa Occidental, publica la resolución contra el uso de sustancias dopantes en el deporte y se inicia la elaboración de las primeras leyes en Italia, Francia y Bélgica (Casajús Mallén, 2005).

En 1967 el COI crea la Comisión Médica con el objetivo de ocuparse de la problemática del dopaje. El objetivo primario de esta organización consiste en la protección de la salud de los atletas, igualdad para todos los atletas y respeto ético a nivel médico y deportivo. Los gobiernos y las diferentes organizaciones deportivas nacionales e internacionales continuaron

implementando iniciativas alrededor de la lucha contra el dopaje durante los años 60 y 70. La toma de muestras se hizo más común. Sin embargo, los controles se encontraban limitados por la tecnología del momento y por los mecanismos fraudulentos utilizados por los deportistas para evitar ser detectados (suspensión del uso del medicamento con un tiempo suficiente antes de la competición, cambios de orina, etc.).

En 1983 la introducción de las técnicas de cromatografía de gases y de espectrometría de masas produce un gran avance en la detección de diferentes sustancias, permitiendo detectar por primera vez un gran número de deportistas dopados en los Juegos Panamericanos de Caracas.

El escándalo del *Tour* de Francia de 1998, descrito ampliamente en capítulos anteriores, el creciente aumento del doping en todos los niveles del deporte (recreacional, amateur o profesional) y la falta de uniformidad entre las normativas utilizadas por las diferentes federaciones deportivas hicieron que el COI convocará una conferencia mundial de dopaje a inicios de 1999. En ella se crea la Declaración de Lausana sobre Dopaje en el Deporte, donde se recoge la necesidad de crear una agencia internacional de control antidopaje, independiente del COI. (Casajús Mallén, 2005; Sytkowski, 2004; World Anti-Doping Agency, 2007).

Agencia Mundial Antidopaje (AMA)

La AMA fue creada el 10 de noviembre de 1999. La AMA es el organismo que actualmente fomenta, coordina y supervisa la lucha contra el dopaje en el deporte a nivel internacional. Está representada por los Gobiernos, las Federaciones Internacionales, el COI, los Comités Olímpicos Nacionales y otros organismos.

Uno de los mayores logros realizados por la AMA ha sido la creación del programa mundial antidopaje que incluye todos los elementos necesarios para asegurar una buena práctica y una óptima armonización de los

programas antidopaje a nivel internacional y nacional. Los elementos que lo componen son: el código mundial antidopaje, los estándares internacionales y los principios de buenas prácticas del laboratorio (BPL ó GLP sigla en inglés de *Good Laboratory Practices*).

Código Mundial Antidopaje

El código es el documento fundamental que proporciona el marco para las políticas, normas y reglamentos de las organizaciones deportivas como el COI, el Comité Paraolímpico Internacional, las federaciones internacionales, las organizaciones nacionales de antidopaje y las autoridades públicas.

El 5 de marzo de 2003, en la segunda Conferencia Mundial sobre el Dopaje en el deporte, se establece por unanimidad adoptar el Código como base para la lucha contra el dopaje. El 1 de enero de 2004 el código entra en vigor.

En la primera parte se describe detalladamente todo lo relacionado con el control antidopaje. En ella se define el dopaje, como la infracción de una o más de las normas antidopajes descritas en el Artículo 2 del código, las cuales son resumidas en la tabla 6. El código describe claramente que el análisis de muestras de control antidopaje debe ser llevado a cabo por laboratorios acreditados por la AMA, los cuales deben cumplir con los estándares internacionales para laboratorios de análisis.

Estándares internacionales

Se definen como todos los protocolos donde se describe de forma detallada todos los aspectos técnicos necesarios para la aplicación del código. Su objetivo es lograr una armonización entre las organizaciones responsables de las partes técnicas y operativas específicas del control antidopaje.

Tipos de estándares internacionales aprobados por la AMA

- Lista de Sustancias y Métodos Prohibidos: la lista establece todas aquellas sustancias o métodos que son prohibidos en cualquier situación, está

compuesta por dos capítulos: sustancias prohibidas y métodos prohibidos. Las sustancias prohibidas están clasificadas en 5 familias: Anabolizantes, hormonas y sustancias relacionadas, β -2 agonistas, antagonistas estrogénicos y diuréticos y otras sustancias enmascarantes.

Tabla 6. Acciones que constituyen infracciones de las normas antidopaje.

Artículo	Actos que constituyen infracciones de las normas antidopaje
2.1	Presencia de una sustancia prohibida o de sus metabolitos o marcadores en una muestra corporal de un atleta.
2.2	Uso o intento de uso de una sustancia o método prohibido.
2.3	Rechazar o fallar sin justificación válida a la toma de una recogida de muestra después de una notificación hecha conforme a las normas antidopajes o evitar la recojida de muestras.
2.4	Vulneración de los requisitos en lo que respecta a la disponibilidad del deportista para la realización de controles fuera de la competición, incluido el no proporcionar información sobre su paradero, así como los controles que se consideren fallidos en base a las normas establecidas.
2.5	Falsificación o intento de falsificación de cualquier parte del proceso de control antidopaje.
2.6	Posesión de sustancias o métodos prohibidos.
2.7	Tráfico de cualquier sustancia prohibida o método prohibido.
2.8	Administración o intento de administración de una sustancia prohibida o método prohibido a algún deportista, o la asistencia, incitación, contribución, instigación, encubrimiento o cualquier otro tipo de complicidad en relación con una infracción de la norma antidopaje o cualquier otra tentativa de infracción.

Tomado de WADA, 2003; World Anti-Doping Code.

Los métodos prohibidos están organizados en 3 grupos: Métodos utilizados con la finalidad de incrementar la transferencia de oxígeno, métodos de manipulación química y física y métodos que incrementen el rendimiento mediante el dopaje genético.

Adicionalmente, se hace mención especial a dos grupos: las sustancias prohibidas durante la competición y las sustancias prohibidas durante la competición pero en dependencia al tipo de deporte. En el primer grupo se describen los estimulantes, narcóticos, glucocorticosteroides, cannabis y derivados mientras en el segundo están el alcohol y los beta bloqueantes.

- Estándar internacional para la realización de pruebas: Este estándar permite la armonización en la metodología empleada desde la planeación hasta el momento de la toma de la muestra. Su objetivo es mantener la integridad e identidad de las muestras desde la notificación al atleta hasta su transporte para el análisis en el laboratorio.

- Estándar internacional para el Uso de Exención Terapéutica (TUE, sigla en inglés de *Therapeutic Use Exemptions*): Este estándar tiene como objetivo asegurar que el proceso de concesión de un TUE es igual en todos los deportes y países. Un TUE permite a los atletas que sufran enfermedades o condiciones que requieran el uso de medicamentos que se encuentren en la lista de sustancias prohibidas, puedan obtener una autorización para consumir el medicamento requerido.

- Estándar internacional para laboratorios: Su objetivo es tratar de asegurar la producción de resultados e informes válidos, uniformes y armonizados por parte de todos los laboratorios acreditados. Incluye todos los requisitos necesarios para que los laboratorios de control antidopaje reciban la acreditación por parte de la AMA con el objetivo de demostrar que son técnicamente competentes y poseen la capacidad de producir resultados válidos bajo un sistema de manejo efectivo de calidad.

Actualmente los laboratorios de control antidopaje acreditados por la AMA deben cumplir y aplicar las normativas ISO/IEC 9001 e ISO/IEC 17025. La norma ISO/IEC 17025 denominada “Requerimientos generales relativos a la competencia de laboratorios de ensayo y calibración” establece los requisitos relativos a la competencia técnica de los laboratorios de ensayo y calibración que permiten a los diferentes organismos internacionales aceptar los resultados obtenidos alrededor del mundo. Según esta normativa los laboratorios analíticos deben garantizar la calidad de los resultados mediante un conjunto de medidas que se pueden organizar en cuatro niveles: aplicación de métodos validados, calidad y organización de los métodos

analíticos, sistemas de control interno de calidad y participación en ejercicios de inter-laboratorio o programas de evaluación externa de calidad.

La validación de un método permite determinar las características, limitaciones y factores que pueden modificar el método. Además, permite asegurar la fiabilidad de los resultados mediante la demostración objetiva de que es adecuado para la finalidad o propósito para el cual fue diseñado. La norma ISO/IEC 17025 exige la validación de todos los métodos que se utilicen en el laboratorio así como la revalidación de estos, en el caso de incluir nuevos cambios en el procedimiento.

Los laboratorios son responsables de llevar a cabo protocolos de validación en dependencia del método analítico a estudiar, como también de desarrollarlos, en el caso de nuevos métodos analíticos. Las variables a estudiar dependerán del tipo de método, de sustancia(s) a determinar, de matriz, del rango de concentración y finalmente de los requisitos mínimos impuestos por los organismos oficiales.

Los parámetros más utilizados son: exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, intervalo de trabajo, recuperación, sensibilidad y estabilidad. Actualmente existe un gran número de guías de validación en referencia a los parámetros y requisitos a estudiar en un protocolo de validación. Son más extensas en el caso de los ensayos cuantitativos que en los cualitativos. Sin embargo, en ninguno de los dos casos existe un consenso claro de los parámetros a estudiar (ver tabla 7).

La mayoría de guías ofrecen una definición de los conceptos generales de los parámetros a estudiar pero no ofrecen una aproximación experimental clara. Actualmente algunas de estas guías se han tomado como referencia en la industria farmacéutica, como es el caso de las guías ICH (sigla en inglés, *International Conference on Harmonization*), las guías de la asociación europea de química analítica, EURACHEM (sigla en inglés, *European Analytical Chemistry*), las guías de la agencia americana de alimentos y medicamentos, FDA (sigla en inglés de, *Food and Drug Administration*).

Ambos documentos junto con algunas publicaciones científicas y guías a nivel de organismos nacionales, como es el caso de ENAC (Entidad Nacional de Acreditación) en España, son los instrumentos utilizados para la implementación de un método de validación como de la evaluación estadística de los resultados obtenidos.

Tabla 7. Parámetros sugeridos por algunas organizaciones para la validación de métodos cualitativos.

PARÁMETROS	WADA	ENAC	ICH	FDA	EURACHEM
Especificidad/Selectividad	•	•	•	•	•
Capacidad de identificación	•				
Robustez	•				•
Arrastre	•				
Interferencia de la matriz	•				
Recuperación	•			•	•
Reacción cruzada (anticuerpos)				•	
Límite de detección		•			•
Estabilidad				•	
Precisión (Falsos positivos y negativos)					•

En el siguiente capítulo se describe en detalle los métodos desarrollados hasta el momento con el objetivo de detectar el uso rEPO y análogos en el control antidopaje.

Recombinant Erythropoietin and Analogues. A Challenge for Doping Control

J. A. Pascual, PhD, *f V. Belalcazar, BSc, *f C. de Bolos, PhD, } R. Gutiérrez, PhD, *f
E. Llop, BSc, *f and J. Segura, PhD*^f

Abstract: Erythropoietin (EPO) increases the number of circulating erythrocytes and thus muscle oxygenation. The availability of the recombinant protein (rEPO) has increased the risk of its illegal use in sports, its detection being a difficult challenge. Five different hema-topoietic parameters were initially chosen as indirect markers of rEPO abuse: concentration of serum EPO, concentration of serum-soluble transferrin receptors (sTfR), hematocrit, percentage of reticulocytes, and percentage of macrocytes. New models considering only hemoglobin, serum EPO concentration, and percentage of reticulo-cytes are simpler and seem to be more sensitive when low doses of rEPO are used. A more direct method of urine analysis (isoelectrofo-cusing, double blotting, and chemiluminescent detection) based on the charge differences between rEPO and endogenous EPO, related to their carbohydrate composition, provides proof of rEPO use. Furthermore, this approach permits the detection of darbepoetin, a direct analogue of EPO also known as NESP ("new erythropoiesis stimulating protein"). Recently a protein conjugate, "synthetic erythropoiesis protein" (SEP), containing precision-length, monodisperse, negatively charged polymers instead of oligosaccharides has been synthesized. Finally, EPO-mimetics are molecules capable of acting as EPO in dimerizing the EPO receptor. Two kinds of EPO-mimetics have been described: peptides and nonpeptides. The enhancement of oxygen availability to muscles by rEPO, analogues, and mimetics constitutes one of the main challenges to doping control. Major steps have already been developed for detection of rEPO and some analogues. In the near future, the transfection to an athlete's body of genes that code for erythropoietin might be an emerging doping issue, and sports authorities have incorporated "gene doping" among the prohibited practices.

Key Words: erythropoietin, doping,

detection (*Ther Drug Monit* 2004;26:175-179)

Received for publication October 1, 2003; accepted December 13, 2003. From the *Drug Research Unit and {Molecular and Cellular Biology Unit, Municipal Institute of Medical Research, IMIM, Barcelona, Spain; and f Department of Experimental and Health Sciences, Pompeu Fabra University, Barcelona, Spain. Part of the work presented is based on research projects on rEPO detection sponsored by the International Olympic Committee and the World Anti-Doping Agency. Reprints: Prof José A. Pascual, Unitat de Recerca en Farmacologia, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM-UPF), Carrer Dr Aiguader 80, 08003 Barcelona, Spain (e-mail: jap@imim.es). Copyright © 2004 by Lippincott Williams & Wilkins

Erythropoietin (EPO) is one of the substances included in the International Olympic Committee (IOC)/World Anti-Doping Agency (WADA) list of Prohibited Classes of Substances under the class of "peptide hormones, mimetics, and analogues." Erythropoietin is responsible for the promotion and differentiation of erythroid progenitor cells, leading to an increase of circulating erythrocytes and consequently an improvement of muscle oxygenation. The availability of the recombinant protein (rEPO; Table 1) has broadened its use for therapeutic purposes but has also increased the risk of its illegal use in sport. The degree of evidence for rEPO use can be increased if rEPO can be differentiated from natural urinary EPO (uEPO).

EPO is a glycoprotein. Complex and variable sugar structures accounting for 40% of the total molecular weight are linked at 4 different positions of the single polypeptide chain coded by the gene. Because of the sugar heterogeneity, EPO is in fact a set of many different isoforms, all biologically active. The pharmaceutical product (epoetin) obtained by expressing the human EPO gene in different cell lines (CHO, BHK, etc.) contains exactly the same protein chain (sequence of amino acids), but differences have been described in sugar structures (a posttranscriptional modification directly related with the enzymatic arsenal of the host cell used). Different pharmaceutical preparations can be found, differing in the composition and nature of the carbohydrate moieties. A Greek letter is added to the word epoetin to distinguish among them, so epoetin α , (3,8, and to can currently be found.

MARKERS OF RECOMBINANT EPO ABUSE

The detection of administration of rEPO is a difficult challenge. A simple conventional approach based on population values of the concentration of EPO so that a normal range may be established and used to identify "suspicious" samples is not appropriate. Unfortunately, many times population values show a very wide distribution with great interindividual and/or time variations. Furthermore, population values for EPO are difficult to establish because many factors affect the concentrations naturally occurring. EPO levels react to hypoxic conditions, being very sensitive to altitude (training, etc.) as well as different pathologic or physiologic conditions (sleep

TABLE 1. Different Types of rEPO and its Main Commercial Products and Manufacturing Companies

Epoetin a (rEPO glycoforms pro file a)	Epoetin (3 (rEPO glycoforms pro file (3) Epoch® (Chugai))F
Epoad® (Sankyo)	Epogin® (Chugai)	
Epogen® (Amgen)	Eritrogen® (Roche)	
Epopen® (Esteve)	Erantin® (Boehringer Mannheim)	
Epoxitin® (Janssen-Cilag)	Marogen® (Chugai)	
Eporex® (Janssen) Erypo® (Janssen-Cilag) Espo® (Kirin) Globuren® (Cilag)	Neorecormon® (Roche)	
Procrit® (Ortho Biotech)	Recormon® (Boehringer Mannheim)	
Epoetin tü (rEPO glycoforms pro file to) Epomax® (Elanex)	Epoetin 8 (rEPO glycoforms pro file 8) Dynepo® (Aventis)	
Hemax® (Elanex)		

apnea, renal diseases, etc), making it difficult to establish an acceptable cutoff. A complementary approach is finding indi-rect markers, other surrogate substances, or biologic parameters affected by the ingestion of the forbidden substance.

INDIRECT MARKERS

One of the approaches followed in an attempt to evidence the misuse of rEPO has been the determination of indi-rect markers.¹ Five different hematopoietic parameters were chosen as the most clearly affected by the administration of rEPO: serum EPO concentration, serum soluble transferrin receptor concentration (sTfR), hematocrit, percentage of reticu-locytes (young red blood cells), and percentage macrocytes. After statistical evaluation of all data obtained from the controlled administration of rEPO, mathematical models were built based on logistic regression. Each of the parameters con-tributed to the models with its own "weight" so that a final score was obtained. Based on the different behavior of each of the parameters during and after rEPO treatment, 2 different models were built: the "ON" model, fitting the data during treatment or shortly after, and the "OFF" model, fitting the data weeks after stopping treatment. Once the models were obtained, a cutoff value for the score had to be found for each of the models to identify samples as "presumptive positive." To increase specificity but keep enough sensitivity, the models have continued being revised.² Only parameters that have good stability and/or well-characterized reference standards are now considered. In these second-generation blood tests, parameters could be reduced to only hemoglobin plus EPO concentration in serum for the "ON" model and hemoglobin plus reticulocyte percentage for the "OFF" model (Table 2). These new models are simpler and seem to be more sensitive when low doses of rEPO are

TABLE 2. Revised Mathematical Equations from Blood Parameters Proposed for the "ON" and "OFF" Models to Suspect rEPO Abuse²

ON model
ON score = $Hb + 9.74 \ln(EPO)$ or $Hb + 6.62 \ln(EPO)$ + $19.4 \ln(sTfR)$ OFF model
F score = $Hb - 60 (ret\%)^{1/2}$ or $Hb - 50 (ret\%)^{1/2} - 7 \ln(EPO)$

Hb refers to hemoglobin, EPO to erythropoietin, sTfR to soluble transferrin receptors, and ret% to percentage of reticulocytes.

used while providing good retro-spectivity in the period after the end of the administration.

The method requires the use of blood. That is not the regular specimen obtained from the athletes and requires a phlebotomist and particular conditions during the sampling procedure. To now, the impossibility of having a B sample for counteranalysis because of the instability of the parameters measured in whole blood has also been a major drawback. Nevertheless, and despite those problems, the method is fast and relatively cheap so that it can effectively be used for screening purposes, particularly in major events such as Olym-pic Games, where many if not all endurance athletes are expected to be controlled. At present, some federations are routinely using blood sampling. Parameters measured are hematocrit, hemoglobin concentration, and percentage of reticu-locytes. These parameters are used to decide whether a non-start ruling on a health risk basis is issued while triggering a further confirmatory test for EPO.

DIRECT DETECTION

The degree of evidence for rEPO use can be increased if rEPO can be differentiated from uEPO. One "direct" approach to evidence the structural differences between rEPO and uEPO in human urine appeared in the scientific literature early in 2000^{3,4} following previous suggestions.⁵

The differences in carbohydrate composition between rEPO and endogenous EPO result in changes in the final net charge of the molecule at a certain pH. These differences may be observed using electrophoretic techniques in which proteins are separated when submitted to the charge effects of an elec-tric field. The method described by Lasne et al uses isoelectric focusing in gel. After separation according their isoelectric points (pI), proteins are transferred from the gel into a mem-brane (blotting), where both recombinant and natural EPO are targeted by a monoclonal antibody raised against EPO. Subse-quenty, the antibody is transferred to a second membrane (giving a mirror image of the positions where EPO was).

This antibody is then addressed by a second, biotin-labeled, anti-species polyclonal antibody. Finally, spots containing biotin are recognized by streptavidin linked to horseradish peroxidase. In the end, a peroxidase-labeled spot is obtained. When chemiluminescent reagents and hydrogen peroxide get in contact with the peroxidase-labeled spots, light is generated. This light can be detected with extremely high sensitivity. As a result of the detection of the light emitted by the membrane, an "image" is obtained containing the spots where EPO was recognized.

When such a method was used, it could be observed that endogenous EPO gave rise to a pattern of spots different ("more acidic") from the one obtained when rEPO was applied (Fig. 1). In the first instance, a positivity criterion was defined based on the percentage of the overall area of the spots that was colocalized with

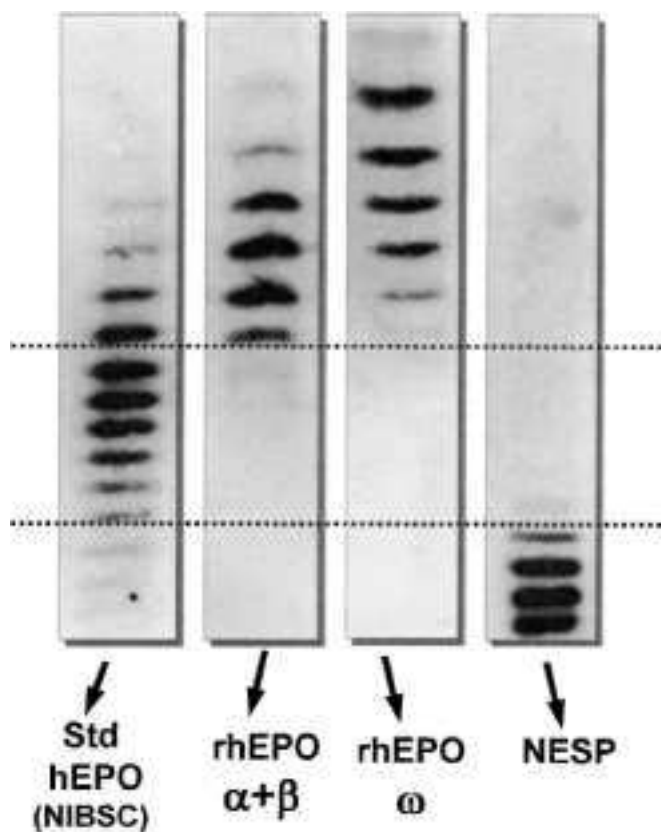


FIGURE 1. Visual evaluation of isoforms developed after application of different types of EPO to isoelectrofocusing followed by double blotting and chemiluminescent detection.^{3,4} The urinary EPO standard (uEPO) was obtained from NIBSC (National Institute for Biologic Standards and Control, UK). The recombinant EPO standard mixture of the α and ω (3 forms) (rEPO α + ω) was obtained from the European Pharmacopoeia. The recombinant standard of EPO to (rEPO ω) was obtained from the commercial pharmaceutical product Epomax (Elanex). NESP (new erythropoiesis-stimulating protein or darbepoetin) was obtained from the commercial pharmaceutical product Aranesp (Amgen).

the recombinant standard (the so-called "percentage of basic isoforms"). After further studies including an interlaboratory comparison,⁶ it became evident that the criteria should include other qualitative elements. At present, the most widespread criterion for the evaluation of the results of such analyses is based in the position of 2 out of the 3 most intense bands. The method is quite labor intensive, taking 3 days to obtain the final result. The World Anti-Doping Agency considers that the test provides the necessary confirmatory evidence and that, even without indirect markers obtained from blood, a positive result obtained from urine is a definitive proof of rEPO use.

ANALOGUES

A direct analogue of rEPO is darbepoetin, also known as NESP ("new erythropoiesis-stimulating protein").⁷ Because the sialic acid content of the oligosaccharide chains plays a key role in protecting the EPO molecule from metabolism, NESP design consisted in changing just 5 amino acids from the poly-peptide backbone to allow the formation of 2 additional N-linked oligosaccharide chains. The result was a molecule with a much longer half-life that could be injected only once per week. From the analytic point of view, the same indirect or direct methods as for rEPO could be used. Particularly, in the urinary test, the "bands" corresponding to the isoforms of NESP could be detected in an area far more acidic than that of the endogenous EPO (Fig. 1). Fortunately, in this case a new, closely related molecule did not require a completely new method.

In the search for the optimal erythropoiesis-stimulating pharmaceutical, recently a group at Gryphon Therapeutics (San Francisco, CA, USA) in collaboration with the Blood Research Institute (Milwaukee, WI, USA) published⁸ the chemical synthesis of a protein conjugate SEP (synthetic erythropoiesis protein) that is nearly identical to the naturally occurring erythropoietin in terms of protein backbone. The protein backbone of SEP, consisting of 166 amino acids, was assembled from 4 separately synthesized peptidic fragments. Two of the fragments permitted a selective introduction of the precision polymers. Structural analysis of the conjugate after protein folding revealed a molecular mass of $50,825 \pm 10$ Da, a pI of 5.0, and a helical secondary structure. The novel agent that circumvents the naturally occurring glycosylation-originated microheterogeneity is believed to have more constant pharmacokinetic properties as a result of the precision polymers. Also it is claimed to be less immunogenic because it is devoid of potential biologic contaminations that might accompany recombinant glycoproteins.

MIMETICS

Other approaches in finding substitutes of EPO are what is generically known as "hormone mimicry."⁹ The EPO-mimetics are molecules capable of dimerizing the EPO receptors and act in the same way as EPO. -

At present 2 kinds of EPO-mimetics have been described: the EPO-mimetic pep-tides and the EPO-mimetic nonpeptides. The EPO-mimetic peptides (EMP) were obtained from screening random pep-tide-phage libraries in the search for an agonist peptide.^{10,11} Considering the solubility and potency properties of all EMPs, EMP1 was selected as the most effective in stimulating cell proliferation (EC₅₀ 400 nM versus rEPO 20 pM), was freely soluble at different concentrations (1-10 uM) in the proliferation assays, and had proliferative potential only on the ery-throid precursor lines.

The EPO-mimetic nonpeptides were obtained by select-ing the residues involved in EMP1 and rEPO binding. By use of combinatorial chemistry, libraries were made based on imi-nodiacetic acid and isoindoline-5,6-dicarboxylic acid tem-plates.¹² Through the screening of this libraries several com-pounds were identified that function as competitors of EPO binding to its receptor. Their maximal activities were modest (15-20% that of rEPO and less than that reported for EMP1).

Other alternatives described that can be included in such mimetic substances are dimeric erythropoietin fusion protein, the active metabolite of vitamin D [1,25(OH)₂ D₃],¹³ and the chemical inducers of dimerization-regulated cell therapy. The dimeric erythropoietin fusion protein¹⁴ consisted of the asso-ciation of two EPO molecules obtained by recombinant DNA-mediated fusion of coding regions. This molecule resulted in a more stable protein than the native monomer with an increased in vivo life span. The vitamin D₃ metabolite [1,25(OH)₂D₃] increased EPO receptor expression at both the mRNA and protein levels as a result of its gene activation. Finally, the chemical inducers of dimerization-regulated cell therapy¹⁵ use genes encoding receptor-bearing fusion proteins.

GENE THERAPY

The transfection to an athlete's body of genes that code for erythropoietin to increase the number of red cells might be an emerging doping practice in the near future.¹⁶ Although the progress of gene therapy in medicine is subject to experimental and toxicologic advances and drawbacks,^{17,18} it can be antici-pated that sooner or later the methodology will be widely avail-able. The sports authorities have been alerted to this potential doping practice. Both the International Olympic Committee (IOC)¹⁹ and the World Anti-Doping Agency (WADA)²⁰ have dealt with the matter and have incorporated "Gene Doping" among the prohibited practices in the official IOC-WADA "List of Prohibited Substances and Methods in Sport" since 1 January 2003.

In experimental animals, stable long-term gene expression of erythropoietin has resulted in sustained release in red blood cells and corresponding high hematocrit values in mouse and monkey. The possibility to modulate the expression of the gene, turning it "on" and "off" appropriately, is still one of the challenges being extensively studied.²¹ Some of the techniques used the

additional administration of a small molecule to trigger the expression.²² Clinical trials are in progress to imple-ment this and other gene therapy approaches in humans.

A first glance on the potential detectability of this mal-practice suggests that present antidoping methodology is not able to flag the presence of the erythropoietin gene transferred to an athlete. Extensive research and innovative proposals (eg, cDNA in muscle biopsies, longitudinal follow-up of EPO gene expression, proteomics, detection of antivector antibodies, in vivo imaging technologies) could be needed to cope with its detectability.

CONCLUSION

The enhancement of oxygen availability to muscles by rEPO, analogues, and mimetics constitutes one of the major challenges to doping control. Major steps have already been developed for detection of rEPO and some analogues. Appli-cation of mimetics or even gene transfer will require further efforts in the near future.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Rafael de la Torre and Dr. Rosa Ventura for helpful discussions.

REFERENCES

1. Parisotto R, Gore CJ, Emslie KR, et al. A novel method utilizing markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica*. 2000;85:564-572.
2. Gore CJ, Parisotto R, Ashenden MJ, et al. Second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica*. 2003;88:333-344.
3. Lasne F, de Ceaurriz J. Recombinant erythropoietin in urine. *Nature*. 2000;405:635.
4. Lasne F, Martin L, Crepin C, et al. Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal Biochem*. 2002;311:119-126.
5. Wide L, Bengtsson C, Berglund B, et al. Detection in blood and urine of recombinant erythropoietin administered to healthy men. *Med Sci Sports Exerc*. 1995;27:1569-1576.
6. Pascual JA, Lasne F, Howe C, et al. project for inter-laboratory comparison of the method for the detection of rhEPO in human urine. Results, conclusions and current status. In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck-Engelke U, eds. *Recent Advances in Doping Analysis (10)*. Köln: Sport und Buch Straub, 2002:135-144.
7. Egrie JC, Browne JK. Development and characterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16(Suppl 3):3-13.
8. Kochendoerfer GG, Chen SY, Mao F, et al. Design and chemical synthesis of a homogeneous polymer-modified erythropoiesis protein. *Science*. 2003;299:884-887.
9. Wells JA. Hormone mimicry. *Science*. 1996;273:449-463.
10. Barbone FP, Johnson DL, Farrel FX, et al. New epoetin molecules and novel therapeutic approaches. *Nephrol Dial Transplant*. 1999;14(suppl 2): 80-84.
11. Biazzo DE, Motamedi H, Mark DF, et al. A high-throughput assay to identify compounds that can induce dimerization of the erythropoietin receptor. *Anal Biochem*. 2000;278:39-45.
12. Goldberg J, Jin Q, Ambroise Y, et al. Erythropoietin mimetics derived from solution phase combinatorial libraries. *J Am Chem Soc*. 2002;124: 544-555.
13. Alon DB, Chaimovitz C, Dvilansky A, et al. Novel role of 1,25(OH)₂D₃ in induction of erythroid progenitor cell proliferation. *Exp Hematol*. 2002; 30:403-409

14. Dalle B, Henri A, Rouyer-Fessard P, et al. Dimeric erythropoietin fusion protein with enhanced erythropoietic activity in vitro and in vivo. *Blood*. 2001;97:3776-3782.
15. Richard RE, Blau CA. Small-molecule-directed Mpl signaling can complement growth factors to selectively expand genetically modified cord blood cells. *Stem Cells*. 2003;21:71-78.
16. Adam L. Gene therapy may be up to speed for cheats at 2008 Olympics. *Nature*. 2001;414:569.
17. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, Yates F, et al. Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *J Gene Med*. 2001 ;3:201-206.
18. Smith L, Byers JF. Gene therapy in the post-Gelsinger era. *JONAS Health Law Ethics Regul*. 2002;4:104-110.
19. IOC Gene Therapy Symposium on "Gene therapy and its future impact on sport," Lausanne, 6 June 2001.
20. WADA Conference on "Genetic Enhancement of Athletic Performance," New York, 18-20 March 2002.
21. Wadler GI. Future and designer drugs: emerging science and technology. In: Bahrke MS, Yeaslis CE, eds. *Performance Enhancing Substances in Sport and Exercise*. Champaign, IL: Human Kinetics, 2002:305-321.
22. Johnston J, Tazelaar J, Rivera VM, et al. Regulated expression of erythropoietin from AAV vector safely improves the anemia of β -thalassemia in a mouse model. *Mol Ther*. 2003;7:493-497.
- 23.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis fue el de realizar una validación y caracterización de las posibles variables que pueden afectar la metodología empleada para identificar las isoformas presentes en algunas de las especies de EPO (uEPO, rEPO alfa, rEPO beta y el NESP) tras su identificación mediante la técnica de IEF e inmunodetección.

Los estudios que componen esta tesis fueron llevados a cabo dentro de los siguientes proyectos: “Method for the detection of recombinant erythropoietin (eEPO) in human urine base don isoelectric focusing (IEF), double blotting and chemiluminescent detection.- Project for final validation-“, financiado por el COI y el proyecto titulado “Unequivocal confirmation of recombinant erythropoietin (rhEPO) in human urine through structural evidences of specific glycosylation, (RHEPOSE)”, financiado por la AMA.

El objetivo principal del primer proyecto fue el desarrollo y la elaboración de la validación del método de acuerdo a las normativas internacionales vigentes. Esta primera etapa se desarrolló en tres fases: Un protocolo de validación a nivel intra-laboratorio, un protocolo de validación inter-laboratorio y un estudio más completo de las posibles variables que afectan el método.

Para las fases uno y dos, los laboratorios que habían sido entrenados y se encontraba desarrollando el método en el mundo fueron llamados a participar en la validación inicial del método.

La primera fase tuvo como objetivos específicos, elaborar una descripción detallada del procedimiento normalizado de trabajo, unificar el material de referencia a utilizar, definir el marcador de positividad a utilizar y realizar un protocolo de validación intra-laboratorio inicial con el objetivo de evaluar la reproducibilidad y el límite de detección de los laboratorios participantes.

En la segunda fase se llevó a cabo la validación inter-laboratorio mediante el uso de muestras ciegas cargadas con diferentes concentraciones de rEPO, preparadas por el NARL (sigla en inglés de National Analytical Reference Laboratory of Australia), con el objetivo principal de evaluar la reproducibilidad del marcador de evaluación.

La última etapa de esta fase consistió en diseñar y realizar un estudio capaz de evaluar aquellas variables y parámetros críticos que afectan el método de IEF para la detección de rEPO en muestras de orina humana.

El segundo proyecto abarcó un gran número de estudios dirigidos a estudiar la glicosilación y su estructura. Dentro de este marco y el de esta tesis los objetivos específicos desarrollados en esta parte fueron:

Estudiar las diferentes cargas que producen los perfiles electroforéticos característicos de la uEPO, rEPO y NESP.

Evaluar los perfiles de IEF que se pueden obtener tras la aplicación de algunos tratamientos enzimáticos a la uEPO, la rEPO y el NESP

Realizar un estudio sistemático de los posibles factores que puede producir alteraciones en los perfiles de IEF en muestras de orina, como es el caso de las denominadas orinas “inestables”.

CAPÍTULO 6

MATERIALES Y MÉTODOS

VALIDACIÓN

Materiales y reactivos

Todos los laboratorios estuvieron de acuerdo en clasificar los materiales y reactivos en dos categorías: críticos y no críticos. Los primeros fueron todos aquellos reactivos o materiales que debían ser solicitados a un mismo fabricante y no podían ser cambiados. Mientras los no críticos fueron clasificados como todos aquellos que podían ser solicitados a cualquier fabricante que garantizará una calidad y pureza adecuada.

Material de referencia

El material de referencia de rEPO seleccionado fue el estándar de referencia denominado: Erythropoietin BRP (Batch No.1), producido por la “European Pharmacopoeia Commission” y reconocido por el “European Directorate for the Quality of Medicines and the Council of Europe”. El estándar contiene 50% de rEPO alfa y 50% de rEPO beta, contiene 250 mg y presenta una actividad biológica de 32500 IU.

Procedimiento normalizado de trabajo

Se ha descrito un procedimiento de trabajo normalizado detallado (ver anexo 1). En resumen el procedimiento para la determinación de rEPO consistió en las siguientes etapas:

1. Preconcentración de la muestra: 20 ml de orina fueron concentrados por filtración utilizando dos tipos de filtros (Centricon plus 20[®] y YM-30[®]) con una membrana con un punto de corte de 30000 Da. El volumen del concentrado denominado retentato fue de 20 a 40 µl.

2. Cuantificación de la concentración de eritropoyetina por ELISA (sigla en inglés de Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay): La concentración de EPO en los retentatos fue medida utilizando el kit comercial Quantikine® IVD® de R&D Systems, el procedimiento fue llevado a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de los retentatos fueron ajustadas a 1500 IU/L antes de ser aplicados al gel de IEF:

3. IEF: 20 µl del retentato de orina ajustado junto con el estándar de rEPO (1500 IU/L), fueron aplicados a un gel de poliacrilamida (T=5%, C=3%) con una concentración de 7M urea y un rango de pI de 2-6. En el ánodo se usó una solución de anfolito 6-8 a un 2% (p/v) y el cátodo una solución de ácido ortofosfórico 0,5M. El IEF fue llevado a cabo bajo las siguientes condiciones: 1W/cm (131 mA máx., 2000 V máx.), 3600 Vh y a una temperatura de 8°C.

4. Doble-inmunttransferencia: después del IEF las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) utilizando un sistema semiseco de transferencia (0,8 mA/cm²) durante 30 minutos y utilizando un tampón de transferencia básico (Tris 25mM-Glicina 192mM). La membrana fue bloqueada utilizando una solución de leche baja en grasa al 5% y luego fue incubada durante 1 hora con el anticuerpo monoclonal anti-EPO hecho en ratón (clon AE7A5, R&D Systems).

El anticuerpo fue transferido a una segunda membrana mediante una segunda transferencia, utilizando un tampón ácido compuesto por ácido acético 0,7% durante 10 minutos y bajo las mismas condiciones que la anterior. Después de la transferencia la membrana fue bloqueada con una solución de leche/tinta china 0,1% y posteriormente fue incubada con un anticuerpo policlonal anti-ratón biotilado. Luego fue incubada durante una hora con una solución de estreptavidina-peroxidasa.

5. Detección por quimioluminiscencia: todo el complejo anticuerpo monoclonal + anticuerpo policlonal + estreptavidina fue detectado por la adición del sustrato de la peroxidasa (Covalight®-Covalab). La luz quimioluminiscente producida fue captada mediante una cámara con dispositivos de carga eléctrica interconectadas, CCD (sigla en inglés de *Charge-Couple Device*), (Fujifilm luminescent image analyzer LAS-1000). Los datos fueron transformados a una imagen computarizada mediante el programa *Image Reader LAS-1000 Pro*, versión 2.1.

6. Procedimiento de análisis de imágenes:

Se describió un procedimiento para definir la forma de analizar y cuantificar la abundancia de las bandas con el fin de calcular el valor del marcador de positividad. Ver anexo 2.

Protocolo de validación

El protocolo de validación preliminar estuvo compuesto por dos partes. Una fase inicial donde se desarrollo un protocolo de validación intra-laboratorio que permitiera evaluar la capacidad de los laboratorios para realizar esta técnica y luego un estudio de validación inter-laboratorio. A continuación se explica la metodología aplicada para ambos estudios.

Protocolo de validación intra-laboratorio

Este protocolo consistió en la preparación de un grupo de muestras a las cuales se les adiciono diferentes concentraciones de rEPO, a una orina normal adquirida por cada uno de los laboratorios participantes. El protocolo estuvo compuesto por tres ensayos.

En el primer ensayo se prepararon las siguientes muestras cargadas con el material de referencia de rEPO, descrito anteriormente: 0,6 IU/L, 1,5 IU/L, 3 IU/L, 6 IU/L y 15 IU/L. Quintuplicados del blanco y de las muestras cargadas a concentraciones de 0,6 IU/L, 3 IU/L y 15 IU/L fueron preparadas para evaluar la precisión mientras las otras dos muestras cargadas con 1,5 IU/L con rEPO fueron preparadas por duplicado.

De acuerdo a los datos obtenidos, cada laboratorio realizo una estimación de la mínima cantidad de EPO que podían llegar a detectar (LOD; sigla en inglés Limit of Detection). Esta estimación fue usada en el segundo ensayo. En este ensayo, se incluyó duplicados del límite de detección seleccionado e igualmente muestras cargadas a diferentes concentraciones (0,6 IU/L, 3 IU/L y 15 IU/L). Estas mismas condiciones fueron utilizadas para el tercer ensayo. La distribución de las muestras en el gel fue establecida de manera que permitiera una correcta evaluación de los parámetros a estudiar.

La precisión fue expresada como la desviación estándar del porcentaje de bandas básicas obtenidos para los replicados de cada muestra y calculado inter e intra-ensayo. La exactitud fue expresada como el valor absoluto de la diferencia entre cada valor individual y el promedio de cada concentración.

Protocolo de validación inter-laboratorio.

Este protocolo consistió en el análisis de muestras ciegas preparadas por el NARL. El cual utilizo un *pool* de orina blanco con una concentración de uEPO entre 2-3 IU/L procedente de voluntarios sanos que no habían recibido rEPO. Las muestras fueron cargadas con el material de referencia de rEPO a las siguientes concentraciones: 1,5 IU/L, 3,0 IU/L, 10 IU/L y 20 IU/L.

Las muestras fueron distribuidas a un volumen de 21 mL (20 mL fueron utilizados para el análisis). Fueron enviadas a los laboratorios participantes congeladas en nieve carbónica. Todas fueron identificadas aleatoriamente con un código numérico, este código fue enviado al director médico del COI. Solo después de obtener los resultados de los diferentes laboratorios, los códigos fueron enviados al coordinador del proyecto (Laboratorio de control antidopaje de Barcelona, Unidad de Farmacología, Instituto Municipal de Investigaciones Médicas).

Evaluación de las variables que afectan el metodo de IEF

Un nuevo protocolo fue desarrollado con el objetivo de estudiar todas aquellas variables que afectan el método. Aunque la metodología es descrita ampliamente en el capítulo de resultados, ya que forma parte de los estudios realizados en esta tesis, en esta sección se describe de forma breve algunos de los puntos de la metodología empleada, no obstante el protocolo de validación es descrito en detalle en el siguiente capítulo y no se incluirá en esta sección.

Las sustancias seleccionadas fueron: Material de referencia Erythropoietin BRP (Batch No.1), producido por la "European Pharmacopoeia Comission", solución farmacéutica de NESP (Darbepoetin, Aranesp, Amgen), rEPO omega (epoetin omega, Epomax, Elanex) y el estándar de uEPO producido por el NIBSC.

Las variables estudiadas fueron: especificidad, selectividad, LOD, reproducibilidad del volumen de concentración, porcentaje de recuperación, factor de respuesta de cada sustancia al ensayo inmunoenzimático ELISA, tiempo de exposición óptima, tiempo máximo de la cinética y reproducibilidad.

El protocolo de IEF siguió el procedimiento estandarizado anteriormente descrito. Sin embargo, algunos reactivos utilizados en la fase de inmunodetección fueron cambiados de proveedor, estos fueron: El anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con biotina procedente de cabra y el sustrato de quimioluminiscencia (Supersignal West Femto) fueron adquiridos de la casa comercial Pierce.

El marcador de positividad utilizado fue el descrito en el documento técnico de la WADA, que incluye criterios para evaluar la presencia de rEPO o NESP en presencia de uEPO. Los criterios son ampliamente descritos en el capítulo de resultados.

Adicionalmente a estos estudios se realizó un análisis del posible uso de otros anticuerpos. Se evaluaron anticuerpos comerciales y anticuerpos policlonales obtenidos a partir de péptidos sintéticos diseñados con el objetivo de poseer diferente selectividad y especificidad entre rEPO y NESP. Los anticuerpos comerciales fueron evaluados utilizando el mismo método descrito anteriormente. En el caso de los anticuerpos policlonales fue necesario prolongar el período de incubación de una hora a toda la noche y/o utilizar un protocolo de desglicosilación parcial de la membrana con las proteínas transferidas antes de la incubación con el anticuerpo. Una mayor descripción de la obtención de los anticuerpos es descrita en el capítulo de resultados.

ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS CARGAS RESPONSABLES DE LOS PERFILES DE IEF.

El estudio de validación permitió conocer las variables que afectan el método. Sin embargo, el por qué de la distribución de las diferentes isoformas en el gel o las variables que pueden afectar la distribución de estas en el gel fue uno de los

objetivos de esta tesis. En el siguiente capítulo se describe de forma resumida los aspectos metodológicos empleados como parte de este estudio.

Diferentes digestiones enzimáticas de tipo endo y exoglicosidasa fueron llevadas a cabo con el objetivo de estudiar las posibles cargas que ocasionan la distribución de isoformas en el gel.

Las proteínas utilizadas fueron uEPO, rEPO y NESP. Se evaluaron la actividad de las siguientes enzimas de origen recombinante: α -2,3,6,8-neuraminidasa, fosfatasa, β -glucuronidasa, PNGase F (péptido-N4-(acetil- β -glucosaminil)-asparagina amidasa y arilsulfatasa de diversos orígenes.

Como control de la actividad de la enzima neuraminidasa se utilizó un tratamiento químico mediante el uso de ácido trifluoroacético, igualmente se utilizaron digestiones totales y parciales.

Para comprobar la especificidad de la enzima arilsulfatasa se realizaron ensayos competitivos utilizando el sustrato de la enzima específica como sustratos alternativos. Estos ensayos fueron llevados a cabo igualmente utilizando orina humana como matriz de la digestión y orinas “activas” es decir orinas que al cargarse con algunas de las proteínas utilizadas producían la alteración de su perfil.

Los productos de degradación obtenidos al realizar las diferentes digestiones llevaron al desarrollo de geles con un rango de pI superior a 6, se prepararon geles con un rango de pI de 2-6 y 2-9. El protocolo de detección en los geles de IEF fue igual al utilizado en la fase de validación.

Información más detallada de la metodología empleada se puede encontrar en el capítulo de resultados.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

A continuación se adjuntan como resultados los 4 artículos presentados en esta tesis.

1. Project for Inter-Laboratory Comparison of the Method for the Detection of rhEPO in Human Urine. Results, Conclusions and Current Status. Pascual J.A, Lasne F, Howe C, Saugy M, Hemmersbach P, Belalcazar V, Martín L, Grainger J, Pfister Y, Mangin P, Nissen-Lie G, Skibeli V. In: W. Schánzer, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck (eds.) Recent advances in doping analysis. Sport und Buch Straufi, Köln, (2002) 10: 135-144.

2. Variables affecting EPO detection by Isoelectric Focusing in human urine samples. Belalcazar V, De Bolos C, Segura J, Pascual J.A. Enviado a revisión a Analytical Letters.

3. Anti-EPO and anti-NESP antibodies raised against synthetic peptides that reproduce the minimal amino acid sequence differences between EPO and NESP. Giménez E, De Bolós C, Belalcazar V, Andreu D, Borrás E, De la Torre B. G, Barbosa J, Segura J, Pascual J.A. Anal Bioanal Chem. 2007 Aug;388 (7):1531-8.

4. Assessing the instability of the isoelectric focusing patterns of erythropoietin in urine. Belalcazar V, Gutierrez Gallego R, Llop E, Segura J, Pascual JA. Electrophoresis. 2006 Nov; 27 (22):4387-95.

Reprint from

RECENT ADVANCES
IN DOPING ANALYSIS
(10)

W. Schánzer
H. Geyer
A. Gotzmann
U. Mareck
(Editors)

Sport und Buch StrauB, Kóln, 2002

J.A. PASCUAL, F. LASNE, C. HOWE, M. SAUGY, P. HEMMERSBACH, V.
BELALCAZAR, L. MARTÍN, J. GRAINGER Y. PFISTER, P. MANGIN,
G. NISSEN-LIE, V. SKIBELI:

**PROJECT FOR INTER-LABORATORY COMPARISON OF THE METHOD FOR
THE DETECTION OF RHEPO IN HUMAN URINE. RESULTS, CONCLUSIONS
AND CURRENT STATUS.** In: W. Schánzer, H. Geyer, A. Gotzmann, U. Mareck (eds.)
Recent advances in doping analysis (10). Sport und Buch Straufi, Kóln, (2002) 135-144) 135-
144

J.A. Pascual¹, F. Lasne², C. Howe³, M. Saugy⁴, P. Hemmersbach⁵, V. Belalcazar¹, L. Martin², J. Grainger³, Y. Pfister⁴, P. Mangin⁴, G. Nissen-Lie⁵, V. Skibeli⁵.

Project For Inter-Laboratory Comparison of the Method for the Detection of rhEPO in Human Urine. Results, Conclusions and Current Status.

1. Institut Municipal d'Investigació Mèdica, IMIM. Barcelona (Spain)
2. Laboratoire National de Dépistage du Dopage, LNDD. Châtenay-Malabry (France)
3. Australian Sports Drug Testing Lab, ASDTL. Pymble (Australia)
4. Laboratoire Suisse d'Analyse du Dopage, Lausanne (Switzerland)
5. Hormone Laboratory, Section for Doping Analysis, Aker University Hospital. Oslo (Norway)

Introduction

Early in 2000, a method for the detection of recombinant erythropoietin (rEPO) in human urine was first introduced by F. Lasne et. al.⁽¹⁾. The method is based on the separation of the different isoforms of EPO (both endogenous and exogenous) using isoelectric focusing (IEF) followed by a double blotting process⁽²⁾ and chemiluminescent detection.

After using the method for the analysis of more than 600 samples, its selectivity and specificity was checked by blind analysis of known negative (population) and positive samples from EPO administration studies before the Sydney 2000 Olympic Games. As a result, the method was used during those Games in combination with another complementary screening method based on the analysis in blood and serum of different haematological parameters affected by the administration of rEPO⁽³⁾.

Because the urinary method is complex, it has required considerable training and practice to successfully establish the method in other doping control laboratories. However once the method was operational in several laboratories it was possible and desirable to carry out a full validation of the method including both intra and inter-laboratory assays. Such study will assist in fully characterising the method by determining the set of parameters which can affect the results.

A protocol was written from the coordinating laboratory and submitted to those laboratories having the method already running in their facilities. At that time (January, 2001), four

laboratories had already been trained by the developing laboratory (LNDD, Châtenay-Malabry, France) and had been checking the method in their own facilities. Thus the laboratories, able to participate in a potential validation protocol were:

LAB	DESCRIPTION
PARIS	Laboratoire National de Depistage du Dopage (LNDD) Châtenay-Malabry, France
BARCELONA (coordinator)	Doping Control Laboratory, Pharmacology Research Unit Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM) Barcelona, Spain
SYDNEY	Australian Sports Drug Testing Laboratory (ASDTL) Pymble, Australia
OSLO	Hormone Laboratory. Section for Doping analysis. Aker hospital Oslo, Norway
LAUSANNE	Laboratoire Suisse d'Analyse du Dopage. Institut Universitaire de Médecine Légale. Lausanne, Switzerland

The protocol was submitted to the Medical Commission of the IOC and funding was granted. A final report was prepared and submitted to the sponsor ⁽⁴⁾.

Experimental

The protocol was divided in two major steps:

- During the first step, a common description of the standard operating procedure for the method was agreed. The identification of reagents considered as critical for the performance of the method was also carried out. As part of that step, further decisions were taken, like the establishment of the rEPO reference standard, the definition of the “marker” that was going to be used to draw conclusions on the presence of rEPO, etc. Also the already existing data gathered by the team developing the method⁽¹⁾ was also evaluated in order to reach final conclusions regarding selectivity and specificity. In addition, a protocol for a simple intra-laboratory validation protocol was also proposed in order to check for intra-laboratory reproducibility and limit of detection.
- During the second step, the inter-laboratory comparison was carried out using the following scheme:

Reference urine samples were prepared by the National Analytical Reference Laboratory (NARL) of Australia. A pool of blank urine (not containing rEPO) with an amount of EPO, as measured by immunoassay around 3 IU/L was prepared. Samples with increasing concentrations of rEPO were then prepared by spiking the blank urine so that the final rEPO concentrations were: 0 (blank urine), 1.5, 3, 10 and 20 IU rEPO/L.

Reference urines were divided in 40 ml aliquots. 5 replicate aliquots of each urine sample were sent to each participating laboratory (5 x 5 = 25 urine samples), blind coded.

Results and discussion

rEPO Reference Standard

The agreed rEPO Reference Standard was:

Erythropoietin BRP (Batch No.1, reference number E1515000), European Pharmacopoeia Commission. E-mail: CRS@mail.pheur.org. Website: <http://www.pheur.org>.

The quality of the standard is recognised by the European Directorate for the Quality of Medicines and the Council of Europe.

Each vial, of a freeze-dried preparation of erythropoietin, contains 250 µg and 32,500 IU of biological activity.

The Marker

The need for a surrogate marker (magnitude to be measured) as a result of the application of the procedure was recognised. The same “marker” as used during the application of the method so far was agreed. The marker, “% of basic isoforms” is defined as follows:

$$\% \text{ basic isoforms} = \frac{\text{sum of areas of basic isoforms}}{\text{sum of areas of all isoforms}} \cdot 100$$

where:

sum of areas of basic isoforms: is the sum of the areas of all bands appearing at isoelectric point (pI's) values above the position defined by the less basic isoform of the reference rEPO standard.

sum of areas of all isoforms: is the sum of the areas of all bands detected along all the pI range.

Evaluation of population data: criterion for positivity

For the establishment of the criterion for positivity, a set of population data was used. The population (N=411, including those samples already studied prior to the Sydney Olympic Games) consisted of samples from all around the world corresponding to different ethnic groups, sex and sports or training conditions (including altitude, hypobaric chamber, etc.) The samples belong to a total of 264 different subjects, some of them tested at different times. The original data was obtained from F. Lasne (LNDD, Châtenay-Malabry, France). The population

data were fitted to a number of distributions, with and without prior transformation. Figure 1 shows the results when a beta distribution was used, giving an excellent score for the Kolmogorov-Smirnov test for goodness of fit.

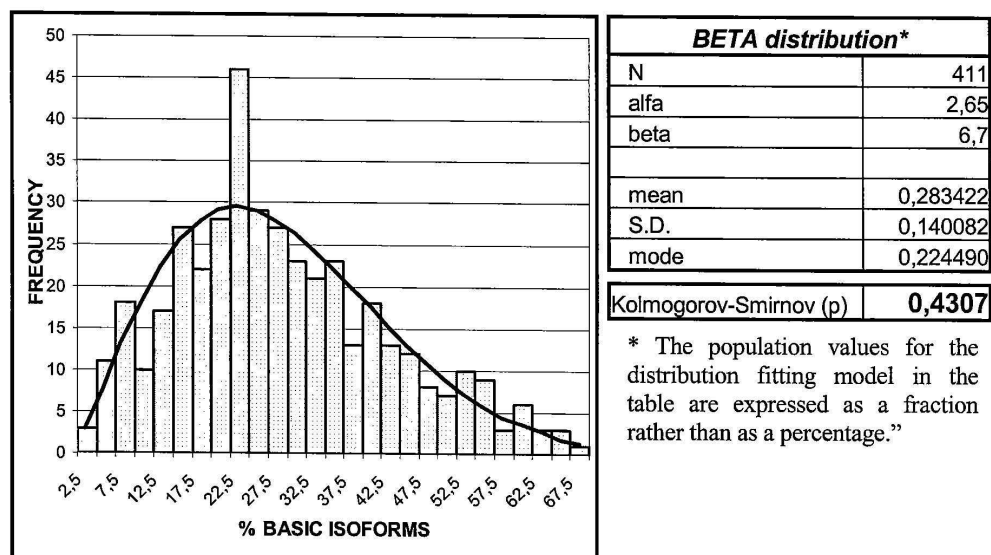


Figure 1. Beta distribution fitting for the evaluation of blank population data for the values of the rEPO marker (%basic isoforms).

Depending on the fitting model and the statistical risk assumed, values of the marker from **80% to 86%** were found as the possible criterion for positivity for the chosen marker.

Analysis of the reference samples from the protocol of the study

One of the first things evidenced by the study was the potential risk for void tests due to the presence of spurious electrophoretic artefacts (spots, smear, etc.). These situations were identified as the major source of variation of the values obtained for the marker among the laboratories suggesting that stringent criteria for the acceptance of an image should be imposed before issuing a result. Figure 2 shows some of the results obtained when the blank urine was analysed. Apart from considerations regarding the differing resolutions obtained by the laboratories and signal to noise ratios of the images, a very similar result was obtained from the point of view of how the results “look like” from an overall evaluation of the image.

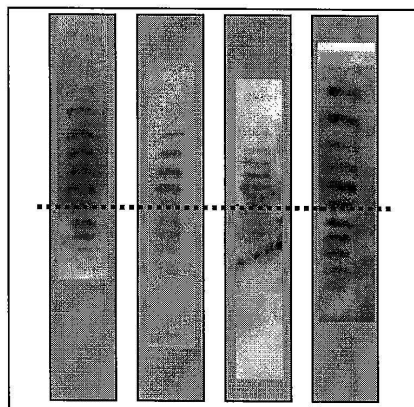


Figure 2. Example of the results obtained by the participating laboratories for the analysis of the pooled blank urine. The line indicates the position of the less basic isoform of the corresponding rEPO standard.

As higher amounts of rEPO were present, better performance was observed, from the sensitivity point of view, and all laboratories gave clear positive results. Figure 3 shows the results obtained by different laboratories for the sample containing rEPO at 3 and 10 IU/L.

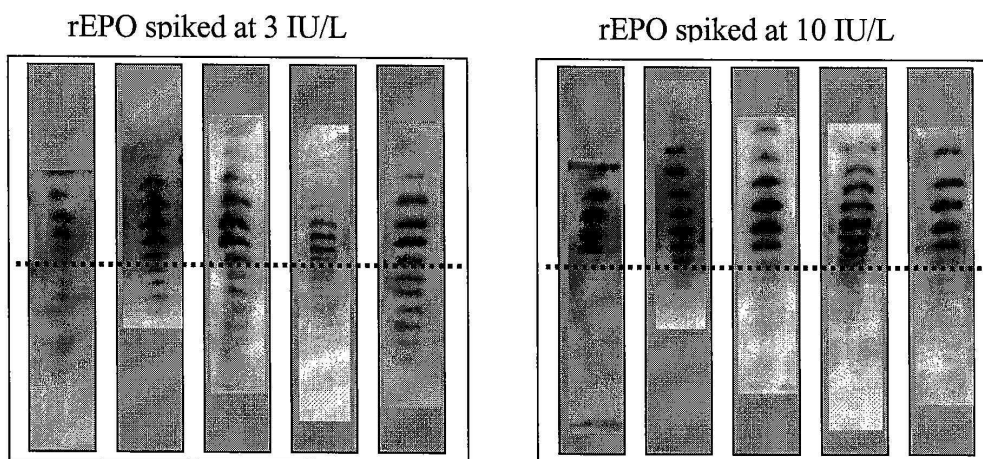


Figure 3. Example of the results obtained by the participating laboratories for the analysis of the urine samples spiked with reference rEPO at concentrations of 3 and 10 IU/L respectively. The line indicates the position of the less basic isoform of the corresponding rEPO standard.

When the images were re-examined and samples not complying with minimal quality criteria regarding signal to noise ratio as well as absence of artefacts casting doubt on the integrity of the result, the results for inter-laboratory reproducibility summarised in Table I were obtained:

Table I. Inter-laboratory reproducibility obtained for some of the samples analysed as part of the current protocol.

BLANK URINE		3 IU/L rEPO		10 IU/L rEPO	
N	10	N	17	N	25
Mean	73.4	Mean	82.2	Mean	97.3
s.d.	4.7	s.d.	5.4	s.d.	1.6
Range	13.8	Range	15.9	Range	7.2
CI95 mean*	2.9	CI95 mean*	2.6	CI95 mean*	0.6
CI95 value*	9.2	CI95 value*	10.6	CI95 value*	3.1

* Confidence Interval ($\alpha=0.05$) of the mean or a value.

As can be observed, the blank urine chosen (pooled sample) resulted in a high percentage of basic isoforms. This is a very unusual circumstance that, on the other hand, has served to investigate its influence on any marker or positivity criterion to be developed.

From the results, it became clear that as the % basic isoforms becomes higher (a positive case) the standard deviation of the results is greatly reduced. Thus when facing a real positive case, it may be expected that the results will be potentially reproducible in any laboratory.

Another important element that came to the attention of the group when analysing the results was the fact that the marker (% basic isoforms) contained only a minor portion of the information contained in the image. Hence, improving the marker by adding other qualitative criteria (e.g. number of visible bands, position of each band, etc.) would probably result in more consistent results. In the end, it would be ideal if such an approach could result in a robust qualitative evaluation just of presence or absence of rEPO.

A possible approach (under evaluation) for a new way to analyse the images including also qualitative criteria is shown in Table II. Two different lists of requisites are listed. The first related with the acceptability criteria for the image obtained. This list is meant to be used in confirmation analysis. Less stringent criteria can be used for screening purposes triggering confirmation of suspicious samples. The second list corresponds to the criteria for positivity.

For the moment, a certain quantitative criterion of comparison between bands in each area of the gel (“so called basic and acidic) seems unavoidable.

Table II. Draft proposal for criteria of evaluation of results: acceptability of images and criterion for positivity.

CRITERIA FOR ACCEPTABILITY	
1	At least 3 bands must be sufficiently intense and resolved to be clearly visible and their area quantified.
2	Relevant areas, spots or smear on a lane that may be part of IEF bands and could significantly affect the consideration or integration of the 3 more intense bands, invalidate the lane.
3	A differences in the position of equivalent bands between two consecutive standards that may cast doubt on the homogeneity of the performance of the gel or the identification of equivalent bands, invalidates all lanes in between.
CRITERIA FOR POSITIVITY (for those lanes fulfilling the criteria for acceptability)	
I	2 out of the 3 more intense bands must be co-localised in the area defined by the bands of the corresponding standards.
II	The 2 more intense bands must show an intensity (integrated area valley to valley) at least double than the most intense band (if any) not co-localised in the area defined by the bands of the standards.

This criteria constitute the essence of the way we examine the overall image obtained. The maximum of the intensity must be in an area “corresponding to an exogenous standard”. There is no need for a great number of bands to be clearly visible providing the particular zone on the image is free of artefacts. And finally the intensity should be sufficiently higher than any “endogenous” band to ensure that we are facing a case in which apart from the appearance of the exogenous substance, we observe the depletion of the endogenous production. The additional advantage is that the criteria are general and do not necessarily depend on the specific standards (they may be alpha or beta rEPO (as they are part of the rEPO standard used in this work) or potentially other preparations of rEPO, as well as for NESP.

Using such an approach the qualitative results obtained for the samples of the present protocol are listed in table III.

Table III. Re-evaluation of results obtained for the samples of the study when using the criteria listed above in Table II.

LAB 1	LAB 2	LAB 3	LAB 4	LAB 5
BLANK URINE				
N.S.	NEG	NEG	NEG	void
void	NEG	NEG	void	void
void	void	NEG	void	NEG
void	NEG	NEG	void	NEG
void	void	NEG	void	NEG
1.5 IU/L rEPO				
N.S.	NEG	NEG	POS	void
void	POS	NEG	void	void
void	POS	NEG	POS	void
void	POS	NEG	POS	void
void	void	POS	void	NEG
3 IU/L rEPO				
POS	POS	POS	void	POS
POS	POS	POS	POS	POS
POS	POS	POS	POS	POS
void	POS	POS	POS	void
void	void	POS	void	void
10 IU/L rEPO				
POS	POS	POS	POS	POS
POS	POS	POS	void	POS
POS	POS	POS	POS	POS
POS	void	POS	void	POS
void	void	POS	void	POS
20 IU/L rEPO				
POS	void	POS	void	POS
POS	POS	POS	POS	POS
void	void	POS	POS	void
void	void	POS	void	void
void	void	POS	void	POS

N.S.: No Sample, void: fail acceptability criteria. NEG: Negative , **POS**: Positive.

As can be seen, no false positive results were obtained. Despite the peculiar profile of the pooled blank urine, all results of the only real blank urine were negative (NEG). The sample with an spiked amount of 1.5 IU/L of rEPO (on a sample already containing almost double the

amount of endogenous EPO) has behaved as being in the range of the “*decision limit*” of the method, as defined by its capacity to differentiate the presence of rEPO in the presence of endogenous EPO (both in specific relative amounts). It should not be forgotten that the sample was, strictly speaking, positive since it contained rEPO. So it is consistent, as it is in all analytical methods having a decision or cut-off limit, that near the decision limit results will be inconclusive. The rest of the samples, seemed to be clearly above the decision limit, thus giving all consistent positive results (POS). The results suggest the importance of carrying out an screening and confirmation assays so that the risk of being near the decision limit is avoided.

Those criteria have to be checked against all the population data to ensure that no false positives are obtained regardless of the origin of the sample or its transportation or storage particularities. Furthermore, re-evaluating the results obtained for sensitivity when real positive samples from excretion studies were analysed, should show complete consistent 100% specificity results as well as equal or even better retrospectivity. As more data is gathered by the different laboratories applying the method, criteria may probably be refined to cope with those situations or new EPO preparations, unexpected today.

Conclusions

The method showed that require extensive training was required for it be successfully applied. Unexpected technical problems during the application of the procedure may result in samples that cannot be evaluated (void tests) more often than with other regular doping analyses.

There should be sufficient evidence of homogeneous performance along the sample lane (no artefacts potentially affecting the result should be acceptable). Stringent requirements must be established before any evaluation is performed.

Results are far more reproducible as the sample contains higher ratios of EPO basic isoforms. This fact will imply a better performance for positive samples and thus greater consistency of the results in an eventual counter-analysis.

The marker used (%basic isoforms) is too simplistic and does not have into account most of the information contained in the images. New criteria should be developed, both for acceptability of results as well as for positivity including other qualitative aspects of the image. The draft criteria presented here is an attempt of rationalisation of what an “expert would consider” when evaluating an EPO image. They may be a good starting point for a final consensus approach for the widespread application of the method.

References

1. Lasne F. and de Ceaurriz J. *Nature*; 2000; 405: 635
2. Lasne F. J. *Immunol. Methods*, 2001; 253: 125-131
3. Parisotto R, Gore C.J, Emslie K,R, Ashenden M.J, Brugnara C, Howe C, Martin D.T, Trout G.J, Hahn A.G. *Haematologica*, 2000;85:564-572.
4. J.A. Pascual and V. Belalcazar. Final Report: 2nd step: Inter-laboratory comparison report. Medical Commission, IOC.

Acknowledgements

This work was financed by the Medical Commission of the International Olympic Committee.

VARIABLES AFFECTING EPO DETECTION BY ISOELECTRIC FOCUSING IN HUMAN URINE SAMPLES.

Viviana Belalcazar^{1,2}, Carme de Bolos³, Jordi Segura^{1,2} and José A. Pascual^{1,2*}

¹ Pharmacology Research Unit. IMIM-Hospital del Mar. Doctor Aiguader, 88. 08003-Barcelona, Spain

² Department of Experimental and Health Sciences, Pompeu Fabra University. UPF. Doctor Aiguader, 88. 08003-Barcelona, Spain

³ Molecular and Cellular Biology Unit. IMIM-Hospital del Mar. Doctor Aiguader, 88. 08003-Barcelona, Spain

*Corresponding author: Telephone number: 933160500; fax number: 933160499; email address: jap@imim.es

Keywords: erythropoietin; doping; electrophoresis; human urine.

Abstract

A protocol was designed and applied to evaluate the parameters affecting the performance of the IEF method used for the detection of recombinant human erythropoietin (rEPO) and its hyperglycosylated analogue NESP in human urine. The experimental protocol followed a 3 assays scheme and allowed the determination of some common parameters like recovery, specificity, repeatability and limit of detection but also other particular ones affecting this method like exposure time (for chemiluminescence), relative response factor (for an ELISA test) or effect of concentration on electrophoretic resolution. It was shown that under these IEF conditions and using the appropriate interpretation criteria, the method specifically detected rEPO and NESP in the presence of endogenous human urinary EPO (uEPO). Cross-reactivity of the antibodies used with some endogenous proteins, as claimed under conditions of SDS-PAGE, was confirmed to be absent under the IEF conditions of the method. Chemiluminescence kinetics allowed a period of ca. 30 min to perform the readings. Resolution between bands was shown to be unaffected by EPO concentration provided the appropriate exposure time was chosen. Repeated exposures at 2 s, 1 min, 3 min and 10 min are recommended for each analysis allowing the selection of the most appropriate. This eliminates the need for quantification of EPO present in order to adjust the final amount applied to electrophoresis. Limit of detection was shown to be better than 500 IU L⁻¹ (3,9 µg L⁻¹) for rEPO, 600 IU L⁻¹ (4.6 µg L⁻¹) for uEPO and 3,7 µg L⁻¹ for NESP in the retentate analysed which is compatible with the majority of human urine samples. The repeatability of the volume reduction factor guarantees that once the factor is known for each sample, it can be used to adjust the starting amount of urine in order to produce the 20 µL of retentate finally applied onto the gel.

Introduction

Human erythropoietin (EPO), the hormone that regulates erythropoiesis [1, 2], contains a single polypeptide of 165 amino acids and four polysaccharide chains: three *N*-linked at Asn24, Asn38, Asn83 and one *O*-linked at Ser126 [3]. Glycosylation is not genetically coded, and it depends on the particular enzymatic endowment of the cell where it is synthesised. As a result of this chemical process, EPO is not a single molecular species but a large family of glycoforms all having the same peptide backbone but different post-translational modifications (mainly differences in glycosylation) [4]. The use of different cell lines or purification methods in the production of the recombinant human protein (rEPO) is the origin of diverse pharmaceutical variants (epoetin alfa, beta, delta, omega, etc.) with characteristic glycans [5]. A hyperglycosylated EPO analogue, NESP (Novel Erythropoiesis Stimulating Protein) was also developed. This product contains five *N*-glycosylation sites (Asn24, Asn30, Asn38, Asn83, and Asn88) and one *O*-linked at Ser126. It has been produced so far as one single variant called darbepoetin alfa [6].

The International Olympic Committee included EPO on the list of prohibited substances in January 1989 [7]. Its detection in body fluids is challenging since the expected concentrations in human urine are very low (ca. 0,1-1 pM) [8] and recombinant variants must be distinguished from the ubiquitous endogenously produced human urinary EPO (uEPO).

Lasne et al. developed a method [9, 10] able to discriminate between uEPO and the rEPO variants epoetin alfa and beta according to their isoelectric focusing behaviour based on their charge differences [11, 12]. This method, currently used in doping control, is also able to detect NESP [13]. However, electrophoretic separation between the multiple glycoforms of uEPO and those from recombinant products (rEPO and NESP), is not complete and some parameters had to be defined in order to verify the presence of these substances beyond doubt. In 2001 an inter-laboratory

comparison was carried out on the method for EPO [14]. The results showed the need for including qualitative markers as part of the identification criteria to better describe the information contained in the image obtained as a result of the application of the method. Later, the World Anti-Doping Agency (WADA) produced a technical document [15] further refining those criteria. In addition, some works described a cross reactive of the monoclonal used in the IEF method, (anti-human erythropoietin antibody, clone AE7A5, from R&D) with other human proteins excreted in the urine, using a SDS-PAGE method [16, 17].

Doping control laboratories are specifically accredited by the World Anti-Doping Agency (WADA). As a pre-requisite they should also comply with the ISO/IEC 17025 quality standard [18]. Given the stringent quality requisites for the application of any method in this environment, a protocol was designed and carried out in order to assess the particular variables affecting this qualitative method.

Experimental

Chemicals and Reference Materials

Reference preparations of rEPO (equimolar mixture of epoetin alfa and beta) and uEPO were purchased from European Pharmacopoeia Commission, Batch No.1 (rEPO BRP standard) and the National Institute for Biological Standards and Control from United Kingdom (uEPO NIBSC standard), respectively. Epoetin omega and darbepoetin alfa were from the corresponding pharmaceutical preparations, EpomaxTM (Elanex) and AranespTM (Amgen) respectively. The materials employed were as previously described [10] except for the biotin conjugated (H+ L) goat anti-mouse IgG and the chemiluminescent substrate Super Signal West Femto, both from Pierce.

Human alfa-1-antichymotrypsin (ACT), alfa-2-HS glycoprotein (HSG) and alfa-2-thiol proteinase inhibitor (TPI) were from Sigma-Aldrich. Tamm-Horsfall glycoprotein (THP), isolated from pooled morning urine as described by Serafini-Cessi et al. [19], was kindly donated by Dr. Rohfritsch (University of Utrecht).

Analytical Procedure

The procedure employed in this work was the one describe. [10, 20], further slightly modified [21]. The method consisted of four steps, namely pre-concentration, isoelectric focusing (IEF) separation, immunoblotting, and chemiluminescent detection. In brief, a 20 mL aliquot of urine was pre-concentrated to obtain a retentate between 20-50 μ L. The retentate containing EPO was focused in an IEF gel (pH 2-6) and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane following the immunoblotting named double-blotting technique [20]. The glycoforms were visualized after chemiluminescent reaction using a CCD camera (Luminescent Image Analyser LAS-1000, Fujifilm).

A commercial ELISA test (Quantikine[®] IVD[®], Human erythropoietin Immunoassay, R&D) was used to determine the concentration of EPO in the retentate in order to adjust the final amount of analyte applied to the gel (regularly ca. 30 mIU).

Identification Criteria

We used the WADA technical document describing the criteria for the identification of rEPO (alfa or beta) and NESP in the presence of uEPO [18]. According to this document, the basic and acidic areas were defined by the position of the bands corresponding to rEPO (Biological Reference Preparation, BRP, of the

European Pharmacopeia) and NESP (Aranesp™, Amgen), see Figure 1. These criteria, different for rEPO and NESP reads as follows:

rEPO

- 1.- In the basic area there must be at least 3 acceptable, consecutive bands, assigned as 1,2, 3 or 4 in the corresponding reference preparation.
- 2.- The two most intense bands either measured by densitometry or assessed visually in the basic area must be consecutive and the most intense band must be 1,2 or 3.
- 3.- The two most intense bands in the basic area must be more intense than any other band in the endogenous area either measured by densitometry or assessed visually.

NESP

- 1.- In the acidic area there must be 3 acceptable, consecutive bands assigned as B, C and D in the corresponding reference preparation.
- 2.- The most intense bands either measured by densitometry or assessed visually must be C or D.
- 3.- The most intense band (C or D) must be more intense than any other band in the endogenous area either measured by densitometry or assessed visually.

The recombinant bands (from rEPO or NESP) were considered to fulfil the condition of “more intense” when their intensity measured by densitometry was at least twice the intensity of the endogenous bands. This is in agreement with previously reported criteria [14] and fits the visual evaluation where the recombinant bands should be unequivocally more intense than the endogenous ones. Since epoetin omega is not covered by the above mentioned WADA technical document and the profile found for epoetin omega is shifted as compared to epoetin alfa or

beta, towards the less acidic part of the basic area. We defined our identification criteria by changing criterion 2 (for rEPO) to “the most intense bands must be 4 and 3 (in this order)”,

Evaluated parameters

- *Specificity/selectivity*: Two particular aspects were considered: one is the ability of the method to identify rEPO (or NESP) in the presence of other unrelated endogenous components of human urine; the other is the ability of the method to distinguish between rEPO (or NESP) and uEPO which is required to discriminate between positive and negative samples.

- *Limit of detection (LOD)*: Defined as the minimum amount of EPO applied to the gel that produces a result (an image) that can be analysed following the evaluation criteria.

- *Repeatability of the volume reduction factor (VF)*. The VF is defined as the ratio between the starting volume of urine and the final volume of retentate obtained after concentration. Its repeatability is expressed as the relative standard deviation (%RSD) of all replicate measurements on the same sample.

- *Recovery (R%)*. Percentage of the amount of analyte present in the original sample that is still present in the retentate finally analysed.

- *Response factor (RF) of the ELISA test*. The RF was defined for each substance as the ratio between the results given by the ELISA (in IU) divided by the real amount present in the sample. For the sake of comparison, relative response factors (RRF) taking rEPO BRP standard as reference was also calculated.

- *Exposure time* (t_e). The time during which the camera is exposed to the chemiluminescent light from the membrane was studied in order to get the maximum signal without losing resolution.

- *Kinetic time* (t_k). The time between the application of the chemiluminescent reagent and the end of the measurement was also studied in order to validate the time window in which the chemiluminescent measure can be performed.

- *Repeatability*. The repeatability of the outcome in the application of the evaluation criteria was studied.

Experimental protocol

A three assay protocol was designed in order to study those variables described above.

- *First assay*: According to established intra-laboratory protocols [22, 23], six blank urine samples were obtained from healthy volunteers (3 male, 3 female) not using rEPO or NESP and analysed in order to verify the specificity of the method (figure 1). Additionally, in order to exclude the interference of some endogenous proteins recently shown to have cross-reactivity with the antibodies used in the method under SDS-PAGE conditions, increasing amounts (0.2, 2 and 20 μg) of ACT, TPI, HSG and THP were analysed as pure substances and as mixtures with 80 IU of uEPO. Furthermore 20 μg of those substances were spiked to the retentate obtained after concentration of 20 mL of blank urine.

- *Second assay*: Four replicates of blank urine (one selected from those obtained for the specificity assay), blank urine spiked with 100 mIU of uEPO NIBSC standard, rEPO BRP standard, rEPO omega and 1 μg of NESP were subjected to the pre-concentration procedure and the final amount of EPO was determined by ELISA.. Finally, the same amount of replicates (four for each substance) were

prepared but in this case, after the pre-concentration step, the reference substances were spiked simulated a 100% recovery.

Recovery was calculated as follows: total amount of EPO (or NESP) still present in each retentate after pre-concentration (determined by ELISA) divided by the measure made in the retentates spiked after the pre-concentration step (mean of all four replicates). In both cases, the mean of the total amount of EPO found in the blank urine (before any spiking) was subtracted from nominator and denominator.

The RF for the ELISA test for each of the analytes was calculated as follows: The amount of analyte in each retentate obtained by ELISA for the retentates spiked with the standards after pre-concentration divided by the known amount of the standard spiked (in both cases subtracting the mean of the amount of EPO obtained for the four blanks). The RF of each analyte relative to rEPO BRP standard (RRF) was also calculated dividing their respective RF values. Discrimination between the different glycoforms (changes in the profile) through pre-concentration was also visually evaluated by comparing both sets of aliquots (spiked prior and after pre-concentration).

- *Third assay*: Aliquots (20 mL) of blank diluted urine were spiked at three different concentrations, four replicates each (low, medium and high concentration controls). The concentrations spiked were: 500 IU L⁻¹ (3.9 µg L⁻¹) for rEPO BRP standard and epoetin omega, 600 IU L⁻¹ (4.6 µg L⁻¹) for uEPO NIBSC standard and 3.7 µg L⁻¹ for NESP for low concentration control and 15,000 IU L⁻¹ (115.5 µg L⁻¹) for rEPO BRP standard and epoetin omega, 18,000 IU L⁻¹ (138.6 µg L⁻¹) for uEPO and 111 µg L⁻¹ for NESP for high concentration control. Aliquots of the retentates obtained for high concentration controls were diluted 1 to 10 to obtain medium controls at 1,500 IU L⁻¹ (11,6 µg L⁻¹) for rEPO BRP standard and epoetin omega, 1,800 IU L⁻¹

(13,9 $\mu\text{g L}^{-1}$) for uEPO and 11.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for NESP. These concentrations correspond to the expected limit of detection (LOD), 3xLOD and 30xLOD, covering more than the expected concentration range in real samples.

IEF analysis was performed randomising the position of the samples along the gel to avoid any position related bias. In the chemiluminescent detection step, the membranes were subjected to different t_e (2 s, 10 s, 30 s, 1 min, 3 min and 10 min). These times were taken at different t_k after the addition of chemiluminescent substrate between 0.5 minutes and 30 minutes.

Results

Specificity

uEPO concentrations in retentates of blank urine samples were between 467 and 1,500 IU L⁻¹, as determined by ELISA. All of them were detectable by IEF and evaluated as negative (figure 1). Blank urine samples analysed showed only slight variations with respect to the uEPO NIBSC standard profile. The overall profile (distribution of band intensities) as well as the number of bands were similar, but the most intense band shifted from band γ or β to band α . However, the criteria for identification of the presence of rEPO were never fulfilled. Some of these profiles shifted towards the basic area have been previously described [21, 24] and recently referred to as “atypical profiles”. Blank urine samples collected for the specificity test were representative of those natural variations in the endogenous EPO profile, as seen after routine analyses of many samples.

The experiment carried out to exclude the potential cross-reactivity with endogenous proteins (ACT, TPI, HSG and THP), gave the results shown in figure 2. Those proteins did not show any signal when submitted to the present procedure even at the highest concentration tested (equivalent to 1

mg L⁻¹ in urine assuming a 100% recovery). Thus when combined with uEPO or spiked to urine, they did not produce any change in the resulting IEF profile.

Repeatability of the VF:

The VF of the blank urine (n=20) showed a mean value of 398 with a relative standard deviation (%RSD) of 9.7%. This corresponds to obtaining a mean of 51 µL of retentate out of 20 mL urine. Since only 20 µL are applied to the gel, the starting volume of urine could have been reduced accordingly (ca. 8 mL) resulting in an important sample saving.

Recovery

Recovery values for each of the analytes are listed in table 1. As can be seen, they have an average value of 62%. There is room for improvement of the method in that step considering the scarce total volume of sample routinely available and the substantial starting urine volume used (20 mL). The effect of the starting volume of urine on recovery and repeatability of the VF should also be considered. There were no significant differences found between the values obtained for the different erythropoietins.

Response Factor

Different units are usually assigned to each analyte. For uEPO NIBSC standard the certified value is 10 IU per vial. For rEPO BRP standard one vial contains 250 µg or 32,500 IU. It is the only standard for which a ratio of 7.7 ng IU⁻¹ (or 2.53 fmol IU⁻¹ taking 30.4 kDa as mean molar mass) can be calculated. For rEPO omega the labelled amount is given as 4000 IU mL⁻¹ and for NESP 25 µg mL⁻¹. The response factor for each compound is expressed in its corresponding units per IU_{ELISA}. (Table

2). The RRF with respect to rEPO BRP standard is also given for the sake of comparison.

No significant differences were found between the RF values of all erythropoietins ($p > 0.05$). For NESP, a trend towards lower RF was observed, although its elevated %RSD resulted in differences with borderline significance ($p = 0.035$ one tail).

The visual examination of the results obtained after the IEF analysis of the samples spiked with the analytes before and after the pre-concentration step, did not show any noticeable glycoform discrimination.

Exposure time (t_e)

Exposure time has a direct impact on sensitivity but also on the resolution between bands. Saturation should be avoided if evaluation is based on the comparison between the intensity of different bands. Figure 3 shows the image obtained for the same membrane (medium control of uEPO) after different exposure times between 2s and 10 min.

The normalised densitometric profiles obtained were identical (when superimposed) for 2 s, 10 s, 30 s and 1 min showing that all of them were valid for evaluation. The profile obtained for 3 min showed a marked loss of resolution between bands. Its use would have implied an error in the evaluation of the relative abundance of the bands. In the profile obtained for 10 min the signal was completely saturated and the resolution lost (figure 3). The optimal exposure time will always depend on the amount of material present on the membrane.

Kinetic time (t_k)

The data obtained demonstrated that chemiluminescent reaction had a slow decline that expanded beyond 30 min. Images taken during that period of

time were equivalent, provided the t_e used was appropriate. Both t_k and t_e can be adjusted in order to obtain an optimal image.

Effect of the concentration on the resolution of the bands.

It can be observed that irrespective of the amount applied to the gel (e.g. 20 μL of a retentate containing 600, 1,800 or 18,000 IU L^{-1} for uEPO NIBSC standard) for all substances studied, equivalent images (superimposable profiles) could be obtained when using appropriate t_e for each concentration..

Limit of detection

The analysis of all “low control” samples resulted in detectable IEF profiles, thus validating the estimated LOD. All samples spiked with uEPO NIBSC standard were evaluated as “negative” (absence of recombinant material) while all samples spiked with rEPO (BRP standard or omega) as well as NESP were evaluated as “positive”. For the purposes of the protocol, this confirms the specificity and sensitivity of the method at the concentrations studied.

Repeatability

As a qualitative approach, in all cases and at all concentrations, samples spiked with exogenous material fulfilled the identification criteria (figure 4). A statistical evaluation of the repeatability was done by using the value of the area of the most intense band of the recombinant area (basic or acidic) divided by the area of the most intense band of the endogenous area as required by the applicable identification criteria. This calculation was applied to the samples spiked with the uEPO NIBSC standard, since they showed bands in all IEF areas. Mean values of the quotients were 1.05, 0.98 and 0.86

for the controls low, medium and high with %RSD of 16.3%, 8.8% and 14.6% respectively. The values obtained for the quotient were not significantly different among the concentrations tested ($p>0.05$). This result confirms quantitatively the finding that the concentration has no effect on the resolution of the bands. This is true assuming the appropriate exposure time is chosen for each sample. Accordingly, retentates with concentrations in the range 500-15,000 IU L⁻¹ can be analysed without any noticeable impact of their concentration on the final result.

As an estimation of the uncertainty of the measurement of such quotient, the pooled standard deviation for all values obtained at the three concentrations tested was calculated. An uncertainty value of 0.42 was obtained (taking three times the standard deviation).

Discussion

The overall method performance depends on some parameters like recovery, effect of the amount of analyte on resolution and kinetics of the chemiluminescent reaction. The three assay protocol described here allows the specific evaluation of those parameters.

Regarding specificity, it was demonstrated that all blank samples gave a “negative” evaluation result. Profiles slightly shifted towards the basic area (“atypical profiles) have been shown to not affect specificity. It was also confirmed that the cross-reactivity of some endogenous proteins under SDS-PAGE conditions [16, 17], was completely absent under the conditions of the IEF method even at concentrations up to 1 g·L⁻¹. Neither uEPO NIBSC standard or urine samples in which their natural content was supplemented with those additional substances, changed their profiles at all. Recently, the lack of specificity of the primary antibody

used has been claimed as the potential cause for false positive results [16, 17]. However, the evidences were not based on the strict application of the conditions of method described but using others (e.g. SDS-PAGE or 2D gels) and were further refuted [27]. Further correspondence added either purely theoretical arguments [25] or data not based on experimental results in human urine nor at concentrations shown to occur in human urine [26]. The primary antibody used (clone AE7A5) is considered an integral part of the method and as such is reflected in the applicable technical document by WADA (15). No other antibody tested so far has given a comparable sensitivity, although others may offer different selectivities (29). While it is clear that the primary antibody used (clone AE7A5) is not monospecific (considering the full proteome from any organism), the experiments herein performed, demonstrated and confirmed the lack of cross-reactivity for at least ACT, TPI, HSG and THP under the conditions applied.. Hence the specificity of the method for the scope of the protocol is compliant with the applicable standards for validation

The potential cross-reactivity of the antibody for other human or non human proteins [16, 17, 25, 26] can never be discarded. In fact, since the antibody binds to an epitope within the first 26 amino acids of the NH₂ terminus, it is able to detect not only uEPO or rEPO but also its analogue NESP. The primary antibody used for the ELISA test also shows this cross-reactivity. Hence, the strict application of the conditions of the method, as well as the use of the “interpretation window” defined by the bands of rEPO BRP standard and NESP [27], is essential to ensure the absence of any potentially confounding reactivity.

The repeatability of the VF allowed the use of the value to further calculate the minimum amount of urine necessary to obtain a 20 μ L retentate. Given the shortage of sample in doping control, this is a very relevant parameter.

Recoveries obtained (around 60%) showed the potential for improvement considering the shortage of available sample. The fact that purification is facilitated by the use of filters with a MWCO of 30k Da, very close to the molecular weight of the protein (e.g. 30.4 kDa for EPO and 37.1 kDa for NESP) may explain this result. Losses due to irreversible adsorption to the filter are also expected and some degree of degradation of the protein through the pre-concentration process despite all due precautions (e.g. addition of protease inhibitors) may also explain those findings [28].

t_e and t_k were included in this specific protocol since they may have an impact not only on repeatability, but on LOD and resolution of bands. It could be expected that longer t_e would produce blurred images with certain resolution loss. However, identical (superimposable) profiles were obtained choosing the appropriate t_e , throughout a concentration range wider than that found in real urine samples. This finding eliminates the need for adjusting the amount of EPO to be applied to the IEF gel and consequently the quantification of EPO in the retentate using an immunoassay.

Given the fact that there may be samples with very different concentrations concurrently analysed in the same gel, the optimal procedure will consist of systematically recording multiple images of the final membrane using different t_e . Every lane will then be read at its optimal t_e depending on its concentration.

The established LOD (in the range 100-130 pM in the retentate) are well in the range of urinary concentrations usually found.

Finally, in spite of the multiple steps of the procedure, repeatability showed to be in line with the accepted international standards.

Acknowledgments

This project has been carried out with the support of WADA.

References

- [1] D.Choi , M. Kim, J. Park, J Chromatogr B Biomed Appl. 687 (1996) 189.
- [2] W. Fried, Annu Rev Nutr. 15 (1995) 353.
- [3] M. Takeuchi, M. Kobata, Glycobiology. 1 (1991) 337.
- [4] R.S. Rush, P.L. Derby, D.M. Smith, C. Merry, G. Rogers, M.F. Rohde, V. Katta, Anal Chem. 67 (1995) 1442.
- [5] G. Stubiger, M. Marchetti, M. Nagano, C. Reichel, G. Gmeiner, G. Allmaier, Rapid Commun Mass Spectrom.,.19 (2005) 728.
- [6] J.C. Egrie, J.K. Browne, Oncology (Williston Park). 16 (10 Suppl 11) (2002) 13.
- [7] Prohibited Classes of Substances and Prohibited Methods; In Olympic Movement Antidoping Code; IOC: Lausanne, 1989
- [8] A. Souillard, M. Audran, F. Bressolle, R. Gareau, A. Duvallet, J.L. Chanal, Br J Clin Pharmacol. 42 (1996) 355.
- [9] F. Lasne , J. de Ceaurriz, Nature. 405 (2000) 635.
- [10] F. Lasne, L. Martin, N. Crepin, J. de Ceaurriz, Anal Biochem. 311 (2002) 119.
- [11] L.Wide, C. Bengtsson, Br J Haematol. 76 (1990) 121.
- [12] L. Wide, C. Bengtsson, B. Berglund, B. Ekblom, Med. Sci. Sports Exerc. 27 (1995) 1569.
- [13] D.H. Catlin, A. Breidbach, S. Elliott, J. Glaspy, Clin Chem. 48 (2002) 2057.
- [14] J.A. Pascual, F. Lasne, C. Howe, M. Saugy, P. Hemmersbach, V. Belalcazar , L.Martin, J.Grainger, Y.Pfister, P.Mangin, G. Nissen-Lie,

- V.Skibeli, In: Schänzer W, Geyer H, Gotzmann A, Mareck U (Eds). Sport und Buch StrauB. Recent advances in doping analysis. Proceedings of the Manfred Donike Workshop, 20th Cologne workshop on Dope Analysis; Cologne, Germany, 2002, p. 135.
- [15] F. Lasne, C. Howe, D.H. Catlin DH, G. Nissen-Lie, J.A. Pascual, M. Saugy, Harmonization of the Method for the Identification of Epoetin Alfa and Beta (EPO) and Darbepoetin Alfa (NESP) by IEF-Double Blotting and Chemiluminescent Detection. Wada technical document - TD2007EPO (2007). http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/td2007epo_en.pdf
- [16] World Anti-doping Agency (WADA), International Standard for Laboratories WADA, version 4, (2004), <http://www.wada-ama.org/en/dynamic.ch2?pageCategory.id=372>
- [17] F. Serafini-Cessi, G. Bellabarba, N. Malagolini, F. Dall'Olio, J Immunol Methods. 120 (1989) 185.
- [18] F. Lasne, J Immunol Methods. 253 (2001) 125.
- [19] V. Belalcazar, R. Gutiérrez Gallego, E. Llop, J. Segura, J.A. Pascual, Electrophoresis. 27 (2006) 4387.
- [20] D. Dadgar, P.E. Burnett, M.G. Choc, K. Gallicano, J.W. Hooper, J Pharm Biomed Anal. 13 (1995) 89.
- [21] J.W. Smith, J.W. Lee, G.D. Nordblom, I. Das, B.S. De Silva, J Pharm Biomed Anal. 21 (2000) 1249.
- [22] World Anti-doping Agency (WADA), Clarification about the EPO detection method WADA, (2005). http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/EPO_QA.pdf

- [23] Beullens M, Delanghe JR, Bollen M, Blood. 107 (2006) 4711.
- [24] Khan A, Grinyer J, Truong ST, Breen EJ, Packer NH, Clin Chim Acta. 358 (2005) 119.
- [25] Franke WW, Heid H, Clin Chim Acta. 373 (2006) 189-90.
- [26] Kahn A, Baker MS, Clin Chim Acta. 379 (2007) 173-5.
- [27] Rabin OP, Lasne F, Pascual JA, Saugy M, Delbeke FJ, Van Eenoo P, Clin Chim Acta. 373 (2006) 186-7.
- [28] Menguy T, Chenevois S, Guillain F, le Maire M, Falson P, Champeil P, Anal Biochem. 264 (1998) 141.
- [29] Jiménez E, De Bolos C, Belalcazar V, Andreu D, Borrás E, De la Torre BG, Barbosa J, Segura J, Pascual JA. Anal Bioanal Chem. 388 (2007): 1531

FIGURE 1. Images of the IEF analysis from urine samples used in the protocol to evaluate the specificity. Lane STD: standard solution containing $1,500 \text{ IU L}^{-1}$ ($11.6 \mu\text{g L}^{-1}$) of rEPO BRP standard and $6 \mu\text{g L}^{-1}$ of NESP. Lane STD*: standard solution containing $3,000 \text{ IU L}^{-1}$ ($23.2 \mu\text{g L}^{-1}$) of uEPO. Lanes A to F: urine samples from healthy individuals. Urine shown in Lane D (marked with an asterisk) was selected as blank urine for the validation protocol. Lane F shows a case where the profile is slightly shifted towards the basic area (so called “atypical profile”).

FIGURE 2. Images of the IEF analysis of potentially cross-reacting urinary proteins: Alfa-1-antichymotrypsin (ACT), alfa-2-HS glycoprotein (HSG), alfa-2-thiol-proteinase inhibitor (TPI) and Tamm-Horsfall protein (THP). Lane 1: Solution of the protein ($20 \mu\text{g}$). Lane 2: solution of uEPO standard (0.6 ng). Lane 3: Mixture of the protein ($20 \mu\text{g}$) plus uEPO NIBSC standard (0.6 ng).

FIGURE 3. Lane images and densitometric profiles obtained after different exposure times (t_e) for the control medium (CM) of uEPO NIBSC standard (retentate at $1,800 \text{ IU L}^{-1}$ or $13.9 \mu\text{g L}^{-1}$) from 2s to 10min. STD1: lane of a solution of uEPO NIBSC standard ($1,500 \text{ IU L}^{-1}$ or $11.6 \mu\text{g L}^{-1}$). STD2: lane of a solution mixture of rEPO BRP standard ($1,500 \text{ IU L}^{-1}$ or $11.6 \mu\text{g L}^{-1}$) plus NESP ($6 \mu\text{g L}^{-1}$). A: overlaid profiles corresponding to t_e of 2s, 10s, 30s and 1min. B: profile obtained for $t_e = 3\text{min}$. C: profile obtained for $t_e = 10\text{min}$.

FIGURE 4. Image of the control samples (spiked urine) at 3 different concentrations: CL: low concentration control, CM: medium concentration control and CH: high concentration control. The images for all CL were evaluated at 10 min, while CM and CH were evaluated at 2 sec.

Figure 1.

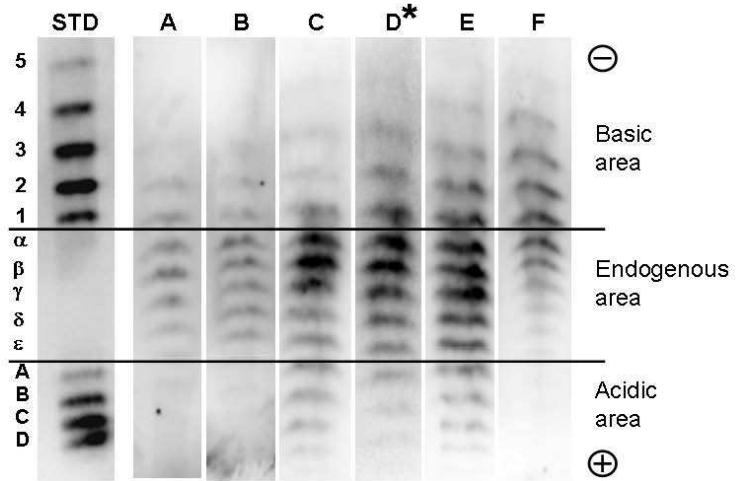


Figure 2.

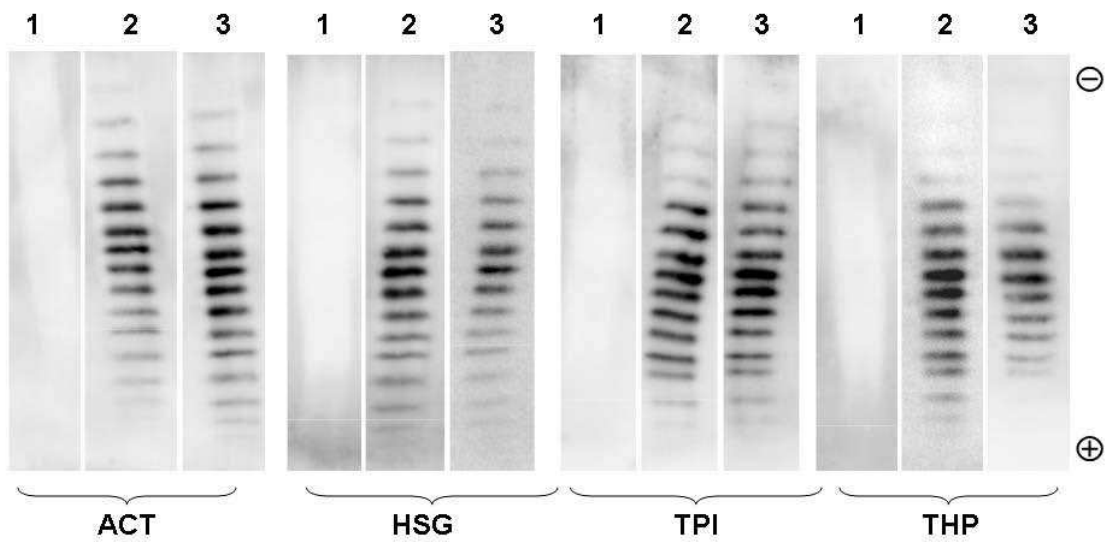


Figure 3

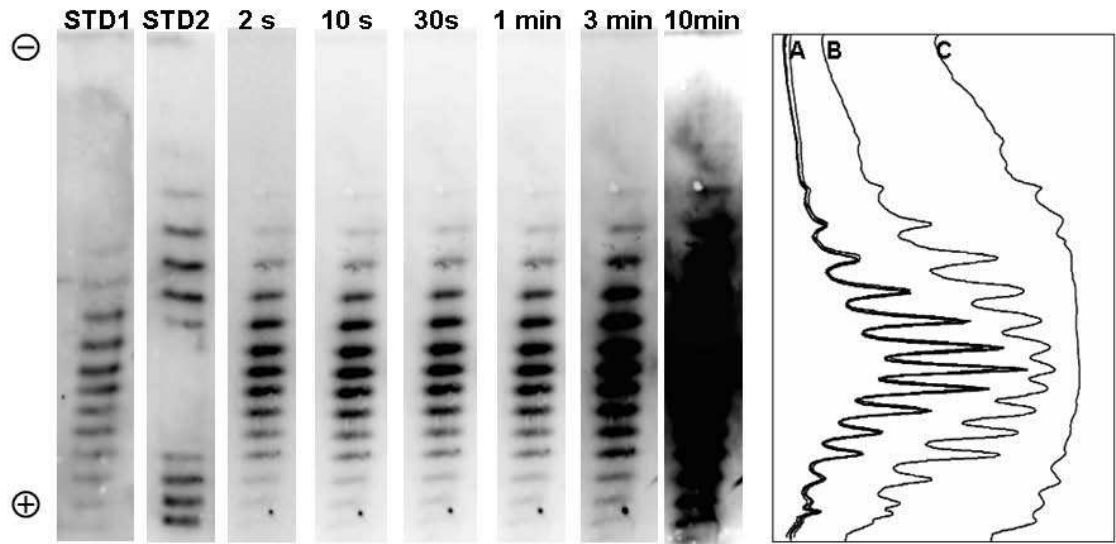


Figure 4

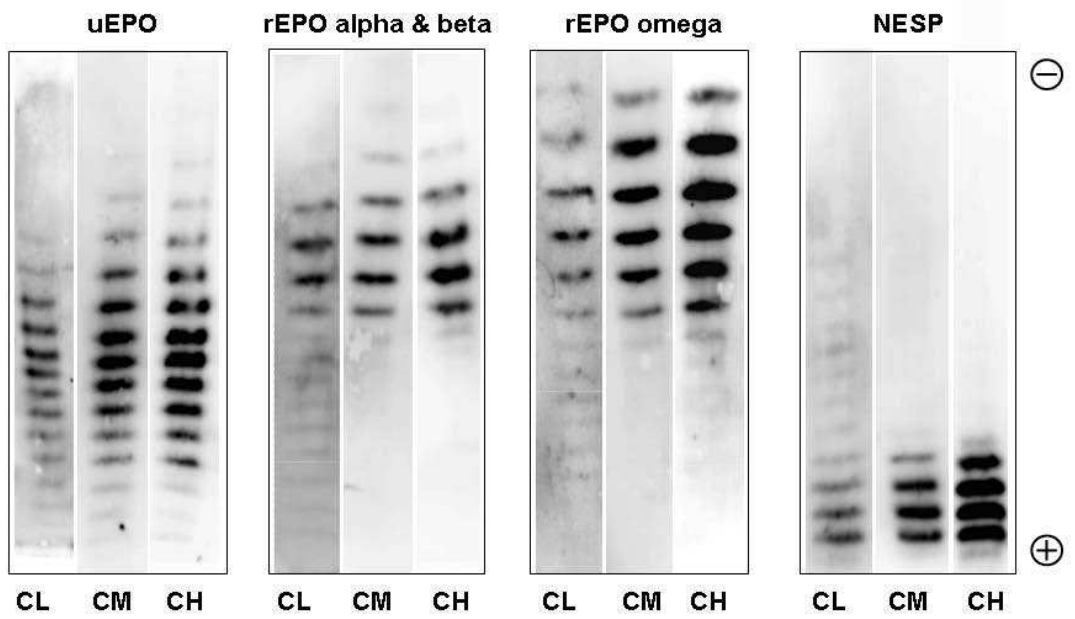


Table 1. Recovery values (%) obtained after the pre-concentration process for the different erythropoietins studied as well as their coefficients of variation (CV%).

	Recovery (%)			
	uEPO (NIBSC std.)	rEPO alfa+beta (BRP std.)	rEPO omega Epomax™	NESP Aranesp™
replicate 1	58.4	87.0	66.8	44.9
replicate 2	58.2	71.8	66.3	38.0
replicate 3	68.6	64.7	56.6	67.5
replicate 4	47.4	69.6	54.5	72.4
Mean	58.1	73.3	61.1	55.7
CV%	14.9	13.1	10.5	30.2

Table 2. Response factors (RF) of the ELISA test used (quantikine, R&D) for the different erythropoietins studied expressed as International Units given by the test (IU_{ELISA}) divided by the amount of analyte. The response factor relative to the one obtained for epoetin alfa and beta (RRF) is also given for comparison.

	ELISA response factors			
	uEPO (NIBSC std.)	rEPO alfa & beta (BRP std.)	rEPO omega Epomax™	NESP Aranesp™
RF($IU_{ELISA} IU^{-1}$)	0.83	0.89	0.83	---
RF($IU_{ELISA} pmol^{-1}$)	---	3.52 ¹	---	2.75 ²
RF (ng IU_{ELISA}^{-1})	---	8.5	---	13.5
CV%	12.8	12.0	7.4	20.4
RRF	0.93	1	0.93	0.78 ³

¹molar mass for rEPO was taken as 30.4 kDa.

²molar mass for NESP was taken as 37.1 kDa.

³RRF calculated using the molar RF.

ANTI-EPO AND ANTI-NESP ANTIBODIES RAISED AGAINST SYNTHETIC PEPTIDES THAT REPRODUCE THE MINIMAL AMINO ACID SEQUENCE DIFFERENCES BETWEEN EPO AND NESP

E. Giménez & C. de Bolós & V. Belalcazar & D. Andreu & E. Borrás & B. G. De la Torre & J. Barbosa & J. Segura J. A. Pascual

Received: 21 February 2007 / Revised: 26 April 2007
/ Accepted: 27 April 2007 © Springer-Verlag 2007

Abstract Erythropoietin (EPO) is a hormone that regulates red blood cell production. Recombinant human EPO (rHuEPO) and NESP (novel erythropoiesis stimulating protein) have been produced for therapeutic purposes and also to improve sports performance. The primary sequences of rHuEPO and NESP differ by just five amino acids. Due to the high homology, no antibodies that are able to discriminate between both molecules have been obtained until now. The aim of the present work was to design synthetic peptides corresponding to the sequence that differs between EPO and NESP (87-90aa), that can then be used as immunogens to develop specific rabbit polyclonal antibodies for selectively detecting EPO and NESP. Three peptides were synthesized: EPO (81-95), NESP (81-95), and NESP (86-104), and these were coupled to KLH

and OVA for immunization and screening purposes, respectively. The sera obtained were tested by ELISA on synthetic peptide-OVA conjugates and purified by immunoaffinity chromatography against the corresponding synthetic peptide. The specific purified antibodies were characterized by ELISA, SDS-PAGE, and isoelectric focusing, followed by western blot. Antisera raised against EPO (81-95) recognized rHuEPO but not NESP. In contrast, anti-NESP (84-106) sera gave a specific anti-NESP response only after immunoaffinity purification on a NESP (86-91) column. An efficient strategy for generating specific antibodies against EPO and NESP can be achieved by selecting suitable synthetic peptides. The antibodies obtained are able to differentiate between rHuEPO and NESP, and may be particularly useful for screening purposes in both therapeutic and antidoping contexts.

Keywords Erythropoietin . NESP. Synthetic peptides . Polyclonal antibodies

V. Belalcazar : J. Segura : J. A. Pascual Unitat de Farmacologia, IMIM-Hospital del Mar, Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain

C. de Bolós (*)
Unitat de Biologia Cel·lular i Molecular, IMIM-Hospital del Mar, Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain e-mail: cbolos@imim.es

E. Giménez : J. Barbosa
Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain

D. Andreu : E. Borrás : B. G. De la Torre
Unitat de Proteòmica i Química de Proteïnes, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Dr. Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain

Abbreviations

aa	amino acid
BSA	bovine serum albumin
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EPO	erythropoietin
HPLC	high-performance liquid chromatography
HIV	human immunodeficiency virus
IAC	immunoaffinity chromatography
IEF	immunoelectrofocusing
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
KLH	keyhole limpet hemocyanin
MALDI-TOF	matrix-assisted laser desorption ionization/time-of-flight

MBS	3-maleimidobenzoic acid <i>N</i> -hydroxysuccinimide ester
NESP	novel erythropoiesis stimulating protein
OVA	ovalbumin

NESP, in order to increase detection selectivity. For this purpose, peptides corresponding to the region (81–104) with the most sequence differences between rHuEPO and NESP were synthesized and used as immunogens. The specificity of the corresponding antibodies in recognizing rHuEPO and NESP molecules was assessed using several immunotechniques.

Introduction

Erythropoietin (EPO) is a hormone mainly produced by the peritubular cells in the adult human kidney cortex [1] that regulates red blood cell production [2]. Human EPO is a glycoprotein approximately 30 kDa in size [3], and about 40% of its total molecular mass corresponds to three N-linked (Asn24, Asn38, Asn83) and one O-linked (Ser126) carbohydrate chains attached to the polypeptide backbone. Recombinant human EPO (rHuEPO), first obtained in 1985 [1], differs from native EPO in its carbohydrate structure [4]. rHuEPO has been used extensively to treat certain forms of anemia associated with chronic renal failure, HIV infection, rheumatoid arthritis, premature birth, and cancer [5]; and has also become popular among endurance sport disciplines as a performance-enhancing agent [6, 7]. A hyperglycosylated analog of EPO, named NESP (novel erythropoiesis stimulating protein), has been obtained more recently [8]. This recombinant analog, which is also produced in hamster ovary cells (CHO), differs from rHuEPO by five amino acid residues (Ala30Asn, His32Thr, Pro87Val, Trp88Asn and Pro90Thr). The presence of two new asparagines amidst the consensus sequence Asn-Xxx-Ser/Thr makes the additional attachment of two extra N-linked oligosaccharide chains, each containing up to four terminal sialic acid residues, possible. These modifications increase the molecular mass of NESP to approximately 37 kDa and the number of sialic acid residues up to 22 [5, 8]. In NESP, just like other glycoproteins, the increase in the number of sialic acid residues results in a longer circulating half-life and a greater biological activity compared to rHuEPO. Consequently, NESP can be administered once a week in order to improve the quality of life for patients [5].

Until now, a large number of monoclonal and polyclonal anti-human EPO-specific antibodies have been obtained and used in several techniques in order to detect EPO in biological samples from chronic kidney disease patients [9], as well as in a method used for doping control [6]. Also, anti-EPO antibodies have been used in capillary electrophoresis to detect and preconcentrate EPO in order to improve on current methods of detection [10, 11]. Antibodies that are able to discriminate between EPO and NESP, however, have not been described thus far.

The aim of this work was to obtain rabbit polyclonal antibodies that are able to differentiate between EPO and

Experimental

Erythropoietin samples

rHuEPO samples were obtained from Eprex® (Janssen-Cilag, High Wycombe, UK). Each prefilled syringe contained 10,000 IU of epoetin alfa, 0.03% Tween 80, 0.5% glycine, and 1 ml of phosphate buffer. rHuEPO from the European Pharmacopoeia was used for IEF experiments, and each sample vial contained 250 µg of rHuEPO (an equimolar mixture of epoetin alfa and beta). NESP (Darbepoetin alfa) was obtained from Aranesp® (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA), and each prefilled syringe contained 20 µg of NESP.

Peptide synthesis and coupling

Peptides corresponding to the EPO (81–95) sequence, its homologous NESP (81–95) and NESP (86–104), as well as the NESP (86–91)-Ahx affinity probe (Table 1) were prepared in C-terminal carboxamide form by solid-phase synthesis methods on 0.1 mmol Rink amide-functionalized polyethyleneglycol–polystyrene. All sequences had an extra Cys residue at the C-terminus to allow conjugation to either carrier protein (first three peptides) or IAC resin (Nesp (86–91)-Ahx). This latter peptide also had an additional spacer residue of 6-aminohexanoic acid (Ahx) next to the Cys. The sequences were assembled in an Applied Biosystems 433 instrument running optimized Fmoc/tBu chemistry that included (i) piperidine–DMF (1:4) deprotection, and (ii) couplings with 1 mmol (10 eq) each of Fmoc amino acid, 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate and 1-*N*-hydroxybenzotriazole, in the presence of 2 mmol *N,N*-diisopropylethylamine in *N,N*-dimethylformamide. Final deprotection and cleavage from the solid support were performed with trifluoroacetic acid/thioanisole/water/phenol/ethanedithiol (82.5:5:5:2.5) for 3.5 h at room temperature. The crude peptides were purified by reverse-phase preparative HPLC on C₁₈ silica. Homogeneous fractions (>95% by analytical HPLC) were pooled to give materials of satisfactory composition and mass by amino acid analysis and MALDI–TOF mass spectrometry, respectively. For immunization and screening purposes, the three peptides were coupled to either keyhole limpet

Table 1 Sequence, chemical data and conjugation ratios of the synthesized peptides used for the production and purification of antibodies against rHuEPO and NESP

Name	Amino acid sequence	HPLC (t_R , min)	MALDI-TOF MS ^b	Conjugation ratio	
				KLH	OVA
EPO (81–95)	LVNSSQPWEPLQLHVC-NH ₂	6.0	1849.1 (1848.94)	1044.2	11.3
NESP (81–95)	LVNSSQVNETLQLHVC-NH ₂	4.8	1782 (1782.91)	1916.2	6.2
NESP (86–104)	QVNETLQLHVVDKAVSGLRSC-NH ₂	4.8	2196.3 (2196.15)	1367.3	7.0
NESP(86–91)-Ahx	QVNETL-Ahx-C-NH ₂	2.9	702.2 (702.37)	–	–

^a Luna C₁₈ (Phenomenex, Torrance, CA, USA) column, 3 μ m particle size, 50 \times 4.6 mm; elution with linear 5–95% gradient of solvent A into B over 15 min; solvent A: 0.045% (v/v) trifluoroacetic acid in water; solvent B: 0.036% (v/v) trifluoroacetic acid in acetonitrile

^b m/z observed; in parentheses, calculated MH⁺ value

hemocyanin (KLH) or ovalbumin (OVA) using 3-maleimido-benzoic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (MBS) and glutaraldehyde conjugation chemistries, respectively. The peptide content of the conjugates was determined by amino acid analysis.

Immunization schedule

Two New Zealand rabbits were immunized with 200 μ g of each synthetic peptide–KLH conjugate in MPL-TDM adjuvant (Sigma, St. Louis, MO, USA) every two weeks, and were boosted monthly after four immunizations. Animals were bled from the auricular artery, seven days after each immunization, starting from the third. Serum samples were stored frozen at –40 °C until used. Animal protocols were approved by the CEEA (Ethical Committee of Animal Experimentation) of the Institution.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

ELISA assays were performed on 96-well plates (Maxi-Sorp, Nunc, Roskilde, Denmark). Wells were coated with 50 μ l of the different antigens (peptide–ovalbumin conjugate, rHuEPO or NESP) at 10–40 μ g/ml in PBS and incubated at 37 °C for 1 h. Unbound sites were blocked with PBS–1% gelatin for 30 min. Fifty microliters of total antisera or purified specific antibodies, diluted in PBS–0.1% Tween 20 (PBS-T), were added and incubated for 1 h at 37 °C. After washing, 50 μ l of alkaline phosphatase–swine anti-rabbit immunoglobulins (Dako, Glostrup, Denmark) diluted 1/1000 were added for 1 h at 37 °C. Reactions were developed with 50 μ l of 4-methylumbelliferyl-phosphate (Sigma) at 1 mg/ml in triethanolamine buffer (pH 9.5) for 30 min at room temperature, and fluorescence was measured by excitation at 360 nm and emission at 460 nm in a Cytofluor™ 2350 (Millipore, Billerica, MA, USA). Pre-immune rabbit sera were used as the negative control. In some experiments, rHuEPO and NESP were reduced and alkylated before coating. For reduction, samples were diluted in PBS containing 10 mM DTT and incubated at 56 °C for

30 min, and then alkylated with 50 mM iodoacetamide for 30 min at room temperature in the dark. Finally, alkylated glycoproteins were desalted with Ultrafree-MC 10 kDa (Millipore).

Immunoaffinity chromatography (IAC)

Antipeptide antibodies were purified by IAC against the corresponding peptides. The synthetic peptides were coupled to EAH Sepharose 4B (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) at 1 mg/ml using MBS as a bifunctional crosslinking agent.

Antipeptide antisera, diluted 1/3 in 10 mM Tris-HCl pH 7.6, were passed through the column 4–5 times (post-column antiserum). After washing with 10 mM Tris-HCl and 0.5 M NaCl pH 7.6 to eliminate the nonspecifically retained fraction (washing fraction), bound antibodies were eluted with 100 mM glycine-HCl pH 2.5 (elution fractions). Eluted fractions were immediately neutralized with 1 M Tris and kept frozen at –20 °C until use.

SDS-PAGE and western blot

rHuEPO and NESP were applied to 10% SDS-PAGE running gels and transferred onto nitrocellulose membranes (Protran, Schleicher and Schuell, Dassel, Germany). In some cases, the immobilized glycoproteins were partially deglycosylated by incubating the membrane with 10 mM NaIO₄ in 25 mM sodium acetate buffer pH 4.5 for 1 h at room temperature in the dark. Non-specific binding sites were blocked using PBST–1% BSA. Immunoblotting was performed by incubating anti-EPO (81–95) and anti-NESP (86–104) antibodies for 90 min (diluted 1/20–1/100). After washing with PBS-T, anti-rabbit-biotin (Dako) diluted 1/3000 was added for 1 h, and after washing, streptavidin–horseradish peroxidase (HRP) (Zymed, San Francisco, CA, USA) diluted 1/3000 for 45 min. Finally, reactions were developed using ECL reagent (Amersham). Pre-immune rabbit sera and a commercial polyclonal anti-EPO antibody (Sigma, ref. E0271) were used as negative and positive controls, respectively.

Immuno-electrofocusing (IEF)

IEF was performed as described previously by Lasne et al. [6, 12]. In brief, rHuEPO and NESP were applied on a polyacrylamide gel ($T=5\%$, $C=3\%$, 7 M urea) with a pH range of 2–6. The samples were focused at a constant power of 1 W/cm of the gel length until 3600 Vh at 8 °C using a flat system (Multiphor II Electrophoresis system, Amersham-Pharmacia). After the IEF, the proteins were transferred (0.8 mA/cm², 30 min) to a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF) using a basic transfer buffer (25 mM Tris–192 mM glycine). The membranes were incubated with the antibody directly or after pretreatment with 10 mM NaIO₄ in 25 mM sodium acetate buffer, pH 4.5, in order to produce partial deglycosylation.

The purified anti-EPO (81–95) and anti-NESP (86–104) antibodies were diluted (1/35) with PBS-T and incubated overnight at room temperature. The polyclonal anti-EPO antibody from Sigma (ref. E0271) was used at 1/500 dilution with PBS–skim milk (1%) and incubated for 1 h. The monoclonal anti-human EPO antibody (clone 9C21D11, R&D Systems) was evaluated at different dilutions (1/1000, 1/500, 1/400, 1/200 and 1/100) and incubated for 1 h in all cases, and the monoclonal anti-human EPO antibody (clone AE7A5, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), which is used as primary antibody in the IEF method for detecting urinary EPO during routine doping control, was used as a positive control under conditions that are described elsewhere [6].

After washing, only the membranes incubated with commercial antibodies (Sigma) were subjected to the double blotting procedure [12]. The antibodies were blotted (0.8 mA/cm², 30 min) to a second PVDF membrane using an acidic transfer buffer (0.7% acetic acid). In accordance with the origin of the primary antibody, anti-rabbit–biotin (1/3000) or anti-mouse–biotin (1/4000) were used for 1 h at room temperature. Finally, the membrane was incubated with streptavidin–HRP (Biospa, SPA, Milano, Italy) for 1 h.

The chemiluminescent light was produced by the addition of the peroxidase substrate (SuperSignal West Femto stable peroxide, Pierce, Rockford, IL, USA). The light was detected using a CCD camera (luminescent image analyzer LAS-1000, Fujifilm, Tokyo, Japan).

Results

Peptide selection

Peptides from the region containing three of the five amino acids that differ between EPO and NESP were selected as antigens in an attempt to raise antibodies that are able to differentiate these two glycoproteins. Their amino acid

sequences, chemical data, and the conjugation rates with KLH and OVA are shown in Table 1. First, two 15-residue peptides containing the EPO- (81–95) and NESP- (81–95) specific sequences were synthesized. A cysteine residue was added to the C-terminal part of each peptide to allow conjugation to KLH and OVA.

Animals immunized with NESP (81–95)–KLH conjugate ($n=2$) did not develop antibody response to the peptide. Hence, a second NESP peptide was designed and synthesized (NESP (86–104)). As shown in Table 1, this peptide was longer than NESP (81–95) and it had three differing amino acids in the C-terminal region, which should make specific immunological recognition more likely.

Antisera titration and purification by immunoaffinity chromatography

In order to analyze the levels of the antipeptide antibodies, pre- and post-immunization anti-EPO (81–95) and anti-NESP (86–104) sera were tested by ELISA using immobilized peptide–OVA conjugates at 10 µg/ml. No differences in the antibody titer and the specificity were obtained between animals immunized with the same peptide–

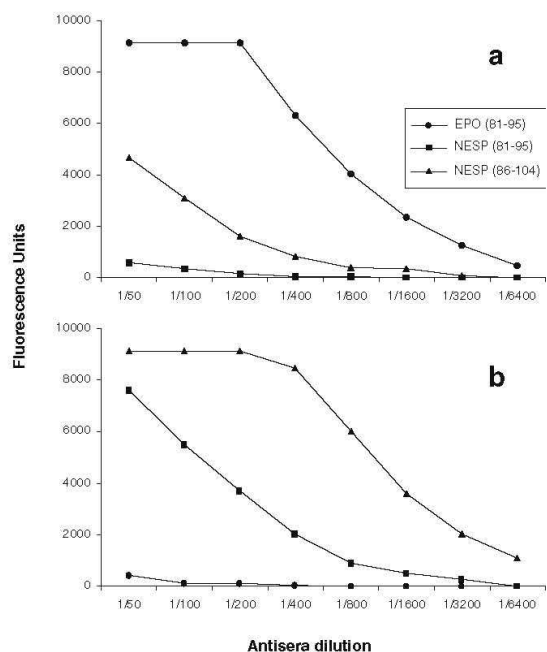
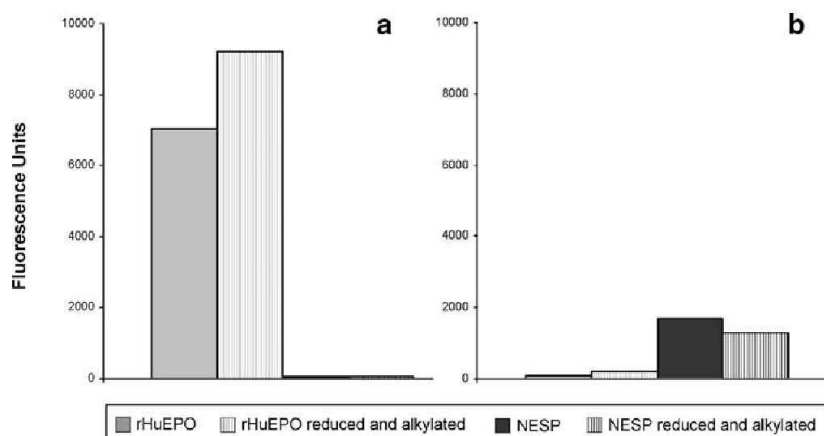


Fig. 1a, b Titration of the antisera against the peptides used for immunization. **a** EPO (81–95) antiserum; **b** NESP (86–104) antiserum. *Circles*, response to EPO (81–95) peptide; *squares*, response to NESP (81–95) peptide; *triangles*, response to NESP (86–104) peptide. ELISA well plates were coated with a 10 µg/ml peptide–OVA conjugate solution

Fig. 2a, b Antipeptide antibody recognition of rHuEPO and NESP in their native state (*solid columns*) and reduced-alkylated state (*hatched columns*). rHuEPO columns are indicated in *gray* and NESP columns in *black*. ELISA test: well plates were coated with 10 $\mu\text{g/ml}$ of rHuEPO and NESP and the antipeptide antibodies were diluted 1/20. **a**) EPO (81–95) antibody recognition; **b**) NESP (86–104) antibody recognition



conjugate. As shown in Fig. 1a, EPO (81–95) antisera strongly reacted with the EPO (81–95) peptide, showed a weaker reactivity for the NESP (86–104) peptide, and did not recognize the NESP (81–95) peptide. In contrast, anti-NESP (86–104) sera recognized the NESP (86–104) peptide, recognized the NESP (81–95) peptide to a lower extent, and did not recognize the EPO (81–95) peptide (Fig. 1b).

The specific anti-peptide antibodies from EPO (81–95) and NESP (86–104) antisera were purified by immunoaffinity chromatography where the corresponding synthetic peptide was immobilized to EAH Sepharose 4B. The different purification fractions were tested by ELISA using the peptide-OVA conjugates, as described. The flow-through (post-column) and washing fractions did not react with the corresponding peptides (data not shown), confirming that all of the antipeptide antibodies were retained by the peptide-EAH Sepharose 4B columns. Furthermore, all of the antipeptide antibodies were found in the first six elution fractions (data not shown). These results demonstrated that immobilized EPO (81–95) and NESP (86–104) peptides efficiently retained all of the anti-EPO (81–95) and anti-NESP (86–104) antibodies from whole antiserum.

rHuEPO and NESP recognition by ELISA

The capacity of the purified antipeptide antibodies to recognize entire rHuEPO and NESP were first tested by

ELISA assays. The native rHuEPO and NESP glycoproteins and the reduced and alkylated forms were immobilized on 96-well plates. The results, shown in Fig. 2a and b, indicate that antibodies raised against EPO (81–95) are able to recognize rHuEPO in its native state. Reduction and alkylation enhanced their ability to detect rHuEPO, indicating better exposure of the recognized epitopes after denaturation. In addition, anti-EPO (81–95) antibodies did not react with either the native NESP or with the reduced and alkylated form (Fig. 2a). These results suggest a high specificity of the anti-EPO (81–95) antibodies for the region of the primary EPO sequence containing the three amino acids (87–88, 90), which differs between EPO and NESP. In contrast, anti-NESP (86–104) antibodies recognized both NESP and rHuEPO, although rHuEPO was recognized to a lesser degree (Fig. 2b). After reduction and alkylation, the reactivity of the antibodies did not improve.

rHuEPO and NESP recognition by SDS-PAGE and western blot

The specificities of the purified antibodies were also assessed by SDS-PAGE/western blot using rHuEPO and NESP. Figure 3, panels 3 and 4, show that anti-EPO (81–95) antibodies only recognized rHuEPO (and not NESP), whereas anti-NESP (86–104) antibodies detected rHuEPO and NESP, which confirmed the results obtained by ELISA. The commercial polyclonal anti-EPO antibody (Sigma) also

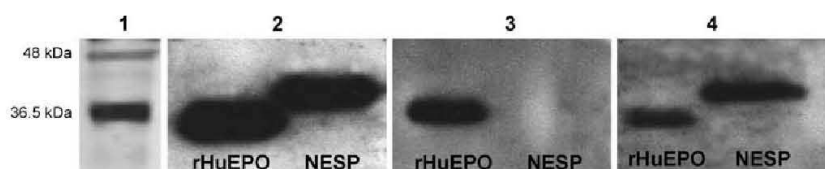


Fig. 3 Recognition of rHuEPO and NESP by different antibodies after separation by SDS-PAGE and western blot detection. *1*, Molecular weight standards; *2*, commercial polyclonal anti-EPO (Sigma) at 1 $\mu\text{g/ml}$;

3, EPO (81–95) antibody diluted 1/100; *4*, NESP (86–104) antibody diluted 1/100. Wells contained 0.5 μg of rHuEPO or NESP

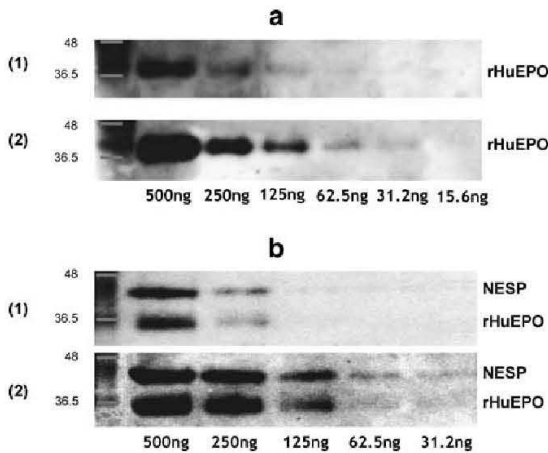


Fig. 4a, b Limits of detection for rHuEPO and NESP reached by SDS-PAGE and western blot using the obtained anti-peptide antibodies and different treatments. EPO (81–95) antibody (**a**) and NESP (86–104) antibody (**b**) to reduced proteins (**1**) and reduced and partially deglycosylated proteins (**2**). Anti-peptide antibodies were diluted 1/100

recognized both rHuEPO and NESP glycoproteins (Fig. 3, panel 2).

The limits of detection for rHuEPO and NESP were determined using decreasing amounts of rHuEPO and NESP. In order to maximize the sensitivity of the antibodies, membrane-immobilized proteins were also partially deglycosylated using sodium periodate. As can be seen in Fig. 4, this treatment enhanced the detection, suggesting that the partial elimination of the carbohydrate chains improved the recognition of these glycoproteins by the corresponding anti-peptide antibodies. Moreover, images obtained for low amounts of protein (62.5 and 31.2 ng) confirmed that anti-NESP (86–104) antibodies had higher specificity for NESP (Fig. 4b). At 1/20 antibody dilution, it was possible to detect down to 7 ng of NESP (0.28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of NESP) with the anti-NESP (86–104) antibody and down to 15 ng of rHuEPO (0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of rHuEPO) with the antibody against the EPO (81–95) peptide using reduced and partially deglycosylated glycoproteins (data not shown).

NESP (86–91)-Ahx IAC purification

In order to isolate the specific population of antibodies to NESP contained in the previously purified anti-NESP (86–104) antibodies, the samples were passed through a column of immobilized NESP (86–91)-Ahx peptide (QVNETL region). The results shown in Fig. 5a indicate that most of the anti-NESP (86–104) antibodies were not retained by the NESP (86–91)-Ahx column, with the exception of a small fraction of the antibodies which eluted from fraction 3 to 6, which specifically recognized the QVNETL sequence. The

specificity of these antibodies to rHuEPO and NESP was evaluated by ELISA (data not shown) and SDS-PAGE/western blot. Results shown in Fig. 5b indicate that the anti-NESP (86–104) antibodies were able to recognize both rHuEPO and NESP, whereas the NESP (86–91)-Ahx-purified antibodies selectively detected NESP. Moreover, this recognition of NESP was improved after partial deglycosylation using sodium periodate. Although the signal obtained for the blots with the NESP (86–91)-Ahx-purified antibodies was rather faint, the results suggest that the immunization with NESP (86–104)-KLH was able to induce a specific immune response against the QVNETL-specific sequence of NESP.

rHuEPO and NESP recognition by IEF

The specificities of the anti-EPO (81–95) and anti-NESP (86–104) polyclonal antibodies were also evaluated by IEF. Results indicate that antibodies to EPO (81–95) kept their specificity for rHuEPO, while NESP was not detected (Fig. 6, panel 1). Interestingly, the antibodies to NESP (86–104) peptide, which detect both glycoproteins,

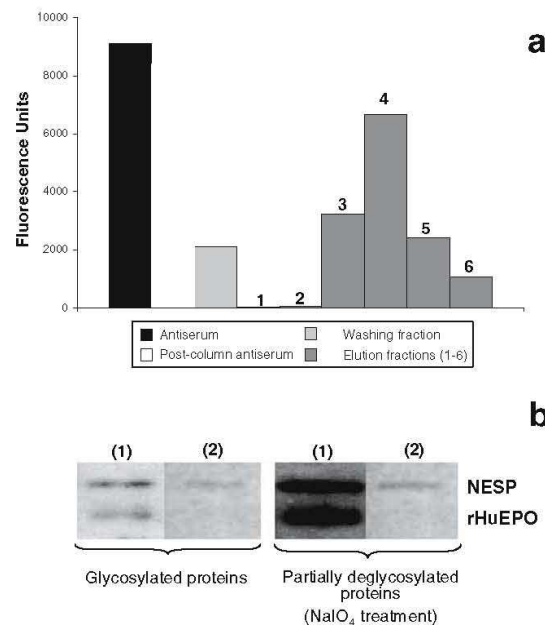
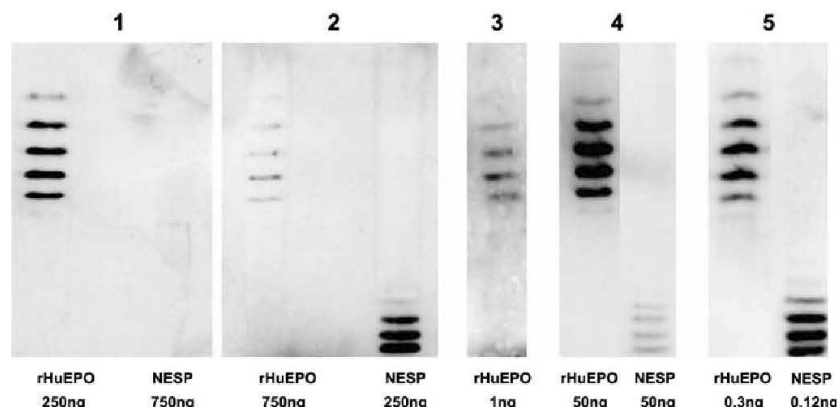


Fig. 5a, b Purification and characterization of NESP (86–104) antibodies purified by immunoaffinity chromatography using the synthetic peptide NESP (86–91)-Ahx. **a** NESP (86–91)-Ahx column behavior during purification of the NESP (86–104) antiserum. ELISA test: well plates were coated with a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ NESP (86–104)-OVA conjugate solution and each purification fraction diluted 1/240. **b** SDS-PAGE/western blot of rHuEPO and NESP with NESP (86–104) antibodies purified with (**1**) NESP (86–104) column at 1/100 dilution and (**2**) NESP (86–91)-Ahx column at 1/60 dilution. Wells contained 250 ng of rHuEPO and NESP

Fig. 6 Comparison of the analysis of rHuEPO and NESP by IEF using different primary antibodies and conditions. 1, EPO (81–95) antibody at 1/35 dilution; 2, NESP (86–104) antibody at 1/35 dilution; both antibodies were evaluated under partial deglycosylation treatment. 3, polyclonal anti-EPO antibody from Sigma (E0271) at 1/500 dilution; 4, monoclonal anti-EPO antibody from R&D (9C21D11) at 1/500 dilution under partial deglycosylation treatment; 5, monoclonal anti-EPO antibody from R&D (AE7A5) at 1/1000 dilution



showed a much higher sensitivity for NESP than for rHuEPO (Fig. 6, panel 2). The antibodies had the same specificity, but the sensitivity was enhanced when the glycoproteins were partially deglycosylated with sodium periodate, corroborating the SDS-PAGE/western blot results (Fig. 6, panel 4).

The behavior of the obtained polyclonal antibodies was compared with commercially available antibodies. Both the anti-human EPO rabbit polyclonal antibody used as control in the SDS-PAGE/western blot experiments (Fig. 6, panel 3) and the monoclonal antibodies (clone AE7A5 and 9C21D11 from R&D) recognized both rHuEPO and NESP under the IEF conditions; however, they differ in sensitivity. Monoclonal anti-human EPO (clone AE7A5) had limits of detection of better than 0.3 ng for rHuEPO or 0.1 ng for NESP at 1/1000 dilution (Fig. 6, panel 5), whereas the monoclonal anti-human EPO 9C21D11 showed much lower sensitivity but one that was greater for rHuEPO than for NESP at 1/500 dilution (Fig. 6, panel 4). Under optimum conditions, including partial deglycosylation over the membrane, the limit of detection was 5 ng for rHuEPO and 20 ng for NESP (data not shown).

Discussion

Synthetic peptides corresponding to the N- and C-terminal sequences of EPO and NESP have been selected in several instances as immunogens. As the sequences of both glycoproteins in these regions are identical, antibodies that are currently available do not discriminate between EPO and NESP [6, 13–19].

In this work, we designed synthetic peptides of 15–19 amino acids which contain three of the amino acids that differ in EPO and NESP, in order to develop specific anti-EPO and anti-NESP antibodies. In the case of the NESP (81–95) peptide, no specific immune response was

obtained, probably due to the conformation acquired during the process of conjugation to KLH and the lower immunogenicity of the VNET (87–90) sequence compared with the specific EPO (81–95) peptide sequence PWEF. As previously reported, peptide immunogenicity is determined by factors such as coupling method, sequence length, hydrophilicity, accessibility, mobility, and protrusion [20]. In order to obtain anti-NESP specific polyclonal antibodies, we designed a new synthetic peptide—NESP (86–104)—containing the specific NESP sequence VNET in the C-terminal region, which could potentially be more accessible to the B-cells. The antisera obtained recognize the NESP and rHuEPO glycoproteins, suggesting that the polyclonal sera contained a pool of specific antibodies that could potentially recognize several epitopes present in the peptide sequence. We isolated the antibodies that specifically recognized the VNET sequence of NESP using IAC with immobilized NESP (86–91)-Ahx peptide, which allowed us to obtain QVNETL-specific antibodies. These antibodies are able to recognize NESP in ELISA and western blot assays and they ignore the rHuEPO glycoprotein, indicating that our immunization–purification strategy is useful for obtaining polyclonal antibodies against the VNET sequence of NESP.

The recognition of rHuEPO and NESP by these antipeptide antibodies was improved by partial deglycosylation as well as reduction and alkylation. Results indicate that the epitopes recognized by the specific antibodies can be masked by the carbohydrate chains in the native and recombinant glycoproteins, and that the folding of the protein via two disulfide bonds can mask the sequences where the antibodies bind, as has been described for EPO [15] and other highly glycosylated proteins that can form oligomers, such as mucins [21, 22] and CD44 [23].

Polyclonal anti-EPO (81–95) and anti-NESP (86–104) antibodies were also tested on rHuEPO and NESP by IEF, which is the method currently used in doping control [6,

10]. The IEF results agree with those obtained by ELISA and SDS-PAGE/western blot, confirming the specificity of the antibodies and also that the sensitivity is enhanced when the glycoproteins are partially deglycosylated. In comparison with commercially available antibodies, the polyclonal antibodies obtained in our study are sufficiently selective to differentiate EPO and NESP. Although their sensitivity is still low, and further studies are needed in order to analyze their reactivity when biological samples are used, this advantage should prove useful in fields such as doping or pharmaceutical control.

Acknowledgments This project has been carried out with the support of WADA and Plan Nacional DEP2005-00234 (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain). The authors thank Marta Garrido and Daniel Moya for their excellent technical assistance.

References

- Fried W (1995) *Annu Rev Nutr* 15:353–377
- Krantz SB (1991) *Blood* 77:419–434
- Fisher JW (2003) *Exp Biol Med* 228:1–14
- Yuen CT, Storrington PL, Tiplady RJ, Izquierdo M, Wait R, Gee CK, Gerson P, Lloyd P, Cremata JA (2003) *Br J Haematol* 121:511–526
- Egrie JC, Dwyer E, Browne JK, Hitz A, Lykos MA (2003) *Exp Hematology* 31:290–299
- Lasne F, Martin L, Crepin N, Ceauriz J (2002) *Anal Biochem* 311:119–126
- Pascual JA, Belalcazar V, de Bolós C, Gutiérrez R, Llop E, Segura J (2004) *Ther Drug Monit* 26:175–179
- Egrie JC, Browne JK (2001) *Nephrol Dial Transplant* 16:3–13
- Paoletti E, Cannella G (2006) *J Am Soc Nephrol* 17(Suppl 4):74–77
- Bornemann C, Burggraef T, Heimbuchel G, Hanisch FG, Winkels S (2003) *Anal Bioanal Chem* 376:1074–1080
- Benavente F, Hernandez E, Guzman NA, Sanz-Nebot V, Barbosa J (2007) *Anal Bioanal Chem* 387:2633–2639
- Lasne F (2001) *J Immunol Methods* 253:125–131
- Amadeo I, Oggero M, Zenclussen ML, Robles L, Pereira D, Kratje R, Etcheverrigaray M (2004) *J Immunol Methods* 293:191–205
- D'Andrea AD, Szklut PJ, Lodish HF, Alderman EM (1990) *Blood* 75:874–880
- Elliott S, Chang D, Delorme E, Dunn C, Egrie J, Giffin J, Lorenzini T, Talbot C, Hesterberg L (1996) *Blood* 87:2714–2722
- Goto M, Murakami A, Akai K, Kawanishi G, Ueda M, Chiba H, Sasaki R (1989) *Blood* 74(4):1415–1423
- Sue JM, Sytkowski AJ (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3651–3655
- Sytkowski AJ, Donahue KA (1987) *J Biol Chem* 262:1161–1165
- Sytkowski AJ, Fisher JW (1985) *J Biol Chem* 260:14727–14731
- Barlow DJ, Edwards MS, Thornton JM (1986) *Nature* 322:747–748
- De Bolós C, Garrido M, Real FX (1995) *Gastroenterology* 109:723–734
- Burchell J, Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Girling A, Lewis A, Millis R, Lamport D (1987) *Cancer Res* 47:5476–5482
- Goodison S, Urdiqui V, Tarin D (1999) *J Clin Mol Pathol* 52:189–196

Original article

Copyright © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Electronic version:

Belalcazar V, Gutiérrez Gallego R, Llop E, Segura J, Pascual JA. [Assessing the instability of the isoelectric focusing patterns of erythropoietin in urine.](#)

Electrophoresis. 2006 Nov;27(22):4387-95

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

ESTUDIO 1.

Los resultados del primer y segundo estudio son la base para el entendimiento y desarrollo del trabajo descripción y elaboración de una metodología de validación que se discutirá en el siguiente capítulo.

Esta primera etapa, demostró que el método es demasiado complejo y laborioso haciendo difícil su implementación a otros laboratorios, además puso de manifiesto la necesidad de validar el método, siguiendo las normativas internacionales ISO, de manera que se pudiera garantizar los resultados en cualquier lugar del mundo donde se implementará la técnica.

En el momento de la elaboración del estudio de validación, 5 de los 33 laboratorios acreditados por el COI habían implementado y desarrollado la técnica. El coordinador del estudio fue el laboratorio de control antidopaje de Barcelona (Unidad de Investigación de Farmacología, Instituto Municipal de Investigaciones Médicas, IMIM).

Siguiendo las normas descritas por los organismos internacionales se llevo a cabo una fase de prevalidación que incluyó la descripción de la metodología, definición de condiciones de trabajo y selección del material de referencia. La elaboración de un procedimiento normalizado de trabajo, que describiera cada una de las partes, fue el primer paso. Más de 160 operaciones fueron descritas y agrupadas en 5 etapas: preparación de la orina, cuantificación por ELISA, IEF, inmunodetección y detección por quimioluminiscencia.

Una vez descrita la metodología se revisaron las condiciones que pudieran ser críticas y controlables para obtener resultados reproducibles. Estas fueron

agrupadas de acuerdo a las propiedades de los reactivos y material a emplear, las condiciones de trabajo y la experiencia del operador.

I. Propiedades de reactivos y materiales: De acuerdo a sus características estos fueron agrupados como críticos (aquellos que deben utilizarse de un mismo proveedor) y no críticos (aquellos que pueden utilizarse de diferentes proveedores). Cabe resaltar de esta clasificación, los siguientes parámetros: composición del gel e identificación mediante anticuerpos. La detección de EPO se basa en la identificación de las isoformas una vez separadas. La separación depende del medio donde se realiza, en este caso se trata de un soporte sólido (gel) preparado manualmente. A su vez la identificación de las isoformas una vez separadas será dependiente de las características del anticuerpo utilizado y por tanto los resultados serán dependientes de la especificidad del anticuerpo. Los anfolitos que determinan el rango de separación del gel y el anticuerpo monoclonal anti-EPO fueron clasificados como críticos.

II. Condiciones de trabajo: La elaboración y almacenamiento del gel debe realizarse a una temperatura no superior de 20 °C. Una temperatura superior produce un proceso de polimerización rápido que dificulta la realización del gel. Igualmente, durante el IEF y las inmunotransferencias, la temperatura ambiental no debe superar esta temperatura, un aumento de ella afecta las características del gel impidiendo su correcta manipulación y ocasionando la aparición de artefactos en el resultado final.

III. Experiencia del operador: Debido a que más del 90 % de las operaciones descritas de esta técnica son de tipo manual, los resultados estarán sujetos al grado de experiencia que el operador tenga en relación con el procedimiento.

Esta clasificación permitió a los laboratorios estandarizar las condiciones de trabajo y además puso en evidencia algunos de los factores críticos de la técnica.

Como material de referencia certificado se determinó utilizar la preparación de EPOr (Erythropoietin BRP, E1515000) producida por la Comisión Europea de la Farmacopea. Este material de referencia está compuesto por un 50% de eritropoyetina recombinante alfa y un 50% de eritropoyetina recombinante beta. Esta preparación fue seleccionada por incluir ambos tipos de eritropoyetina recombinante comúnmente encontrados en el mercado farmacéutico y además por ser un material de referencia certificado. Se determinó incluir esta solución como patrón a ambos lados de un grupo de muestras dentro del lote de análisis.

Finalmente, como criterio de evaluación se seleccionó el porcentaje de bandas. El criterio fue evaluado utilizando una población de 411 muestras provenientes de diferentes partes del mundo, raza, género, deporte y tipos de entrenamiento. Estas muestras habían sido analizadas por el laboratorio que desarrolló el procedimiento. Los resultados indicaron que la población se ajustó más a una distribución de tipo beta, además sirvió para establecer como criterio de positividad valores entre 80 a 86% de bandas básicas.

Después de normalizar las condiciones de trabajo y de evaluación, se llevó a cabo un estudio de evaluación intra-laboratorio con la finalidad de evaluar si realmente los laboratorios participantes estaban en la capacidad de realizar este procedimiento. Dentro del protocolo de validación se estudió la precisión, exactitud y el límite de detección para cada uno de los laboratorios participantes.

Cada laboratorio preparó un grupo de muestras, utilizando como matriz una orina cualquiera. La evaluación demostró que la calidad de los resultados definida como intensidad de las bandas, reproducibilidad, análisis de las imágenes, etc., dependió del laboratorio donde se realizó el análisis. A pesar de ello se pudo concluir que bajo las circunstancias realizadas el criterio de positividad, porcentaje de bandas básicas, fue reproducible. Los valores de precisión y exactitud intra-ensayo e inter-ensayo para cada laboratorio no sobrepasaron el criterio de aceptación ($RSD < 15\%$). Todos los laboratorios determinaron como LOD una concentración de 0,3 IU/L.

Los valores observados para cada una de las concentraciones estudiadas fueron muy diferentes entre los laboratorios, debido a que cada laboratorio utilizó una matriz de orina y una metodología diferente para cuantificar. Al utilizar una matriz diferente, los *ratios* fueron heterogéneos entre ellos, debido al perfil endógeno característico de cada orina. Como resultado de este hecho, los valores del porcentaje de bandas básicas entre los laboratorios no fueron comparables. Una evaluación más óptima de estos parámetros solo fue posible en una segunda etapa, a través del estudio inter-laboratorio utilizando una misma muestra de orina para todos los laboratorios. La falta de homogeneidad observada durante el proceso de evaluación de resultados, hizo relevante describir un protocolo de cuantificación, donde se unificará criterios de integración y definición del ruido de fondo.

Una vez los laboratorios fueron valorados a nivel intra-laboratorio, se desarrolló un estudio de validación a nivel inter-laboratorios. Como se describió anteriormente en el capítulo de resultados, las muestras a estudiar fueron preparadas y enviadas por un laboratorio de referencia. Los resultados de las muestras, a nivel de imágenes como de porcentajes de bandas básicas fueron enviados al centro coordinador.

El análisis de la muestra blanco, orina humana que no contenía rEPO pero sí EPO endógena presente en la orina, presentó un perfil electroforético compuesto por un alto contenido de isoformas básicas ($X = 73,4\%$ bandas básicas), muy cerca del límite observado para los valores de la población, pero aún dentro de los valores considerados como negativos; como consecuencia el estudio de validación estuvo precedido por esta característica.

En una primera etapa, se valoró visualmente la calidad de las imágenes con respecto a los resultados descritos por los laboratorios. Algunos laboratorios a pesar de presentar problemas de ruido de fondo, presencia de artefactos o incluso ausencia de señal, reportaron valores numéricos. Mientras otros laboratorios prefirieron no reportar aquellos casos donde presentaban algún

problema o describirlos como no detectables. Todos los laboratorios presentaron diversos resultados a nivel de ruido de fondo, separación de isoformas, intensidad, presencia de artefactos (manchas, áreas blancas), tanto al ser agrupados por concentración como en conjunto. Esta variabilidad influyo en la manera de evaluar y en los resultados, haciendo evidente la ausencia de criterios cualitativos, previos a la evaluación cuantitativa que permitan excluir de manera uniforme aquellas muestras que presentan algún tipo de problema. Sin embargo, a medida que la concentración de rEPO y la intensidad de las bandas incrementaban, los porcentajes de bandas básicas fueron más reproducibles.

Analizando solo aquellas muestras que no presentaban ningún problema artefactual, el intervalo de confianza fue de $\pm 10\%$ bandas básicas ($\alpha= 0,05$) para las muestras con una concentración de 3 IU/L y de $\pm 3\%$ bandas básicas ($\alpha= 0,05$) para las muestras con una concentración de 10 IU/L, reduciendo drásticamente la dispersión. Según estos resultados obtenidos, se puede esperar que en el caso de una muestra con un porcentaje de bandas básicas del 100% (muestra positiva) la variación deba ser reducida. Por otro lado, en una situación real, la variación aún es menor debido al número de replicados a que esta sujeta la muestra, que como mínimo pueden ser 3, dos provenientes de la muestra A (método de cribado y confirmación) y un último a partir de la muestra B. Bajo estas circunstancias la incertidumbre puede llegar a ser menor del 4%.

En este estudio se concluye que el marcador de bandas básicas, tiene una dimensión únicamente cuantitativa y es parcialmente deficiente al no incorporar o valorar la parte cualitativa del resultado. Esta deficiencia se ve reflejada en algunos resultados que fueron evaluados por los laboratorios sin tener en cuenta la imagen como tal, dando lugar a resultados contradictorios, por ejemplo muestras cargadas con 3 IU/L de EPOr fueron reportadas como negativas ($\bar{X} = 77\%$ de bandas básicas).

Como resultado y conclusión de este estudio un marcador nuevo fue desarrollado. Se propuso redactar unos criterios de evaluación de resultados compuestos por criterios de aceptación y criterios de positividad, que proporcionaran mayor robustez al resultado final.

Estos criterios tratan de englobar la visión general que un experto utiliza en el momento de analizar la imagen en conjunto. Los criterios de aceptación describen en forma resumida aquellos factores que pueden invalidar el análisis de una muestra. Estos pueden tener dos fuentes, una por la calidad de la muestra, es decir concentración de proteínas, degradación, etc. Y aquellos introducidos por parte del experimentador, debido al grado de complejidad de la técnica, caracterizada por múltiples operaciones manuales. Estos últimos serán dependientes de la habilidad y experiencia del experimentador. Por tanto, los criterios de aceptación son una herramienta previa al análisis, ya sea este de tipo cuantitativo o cualitativo, que garantizan al evaluador un análisis óptimo.

Los criterios de positividad se basan en la distribución de isoformas que se observan tanto en muestras negativas como positivas. Las muestras negativas se caracterizan por presentar un perfil electroforético de más de 10 isoformas, las más intensas se ubican entre un pI de 4,0 a 4,5 y el conjunto se encuentra distribuidas entre un rango de pI de 3 a 5. En el caso de las muestras positivas se pueden observar diferentes perfiles. Según los resultados obtenidos a partir estudios de farmacocinética, se ha observado que después de varias dosis de rEPO el cuerpo deja de producir EPO endógena. En algunos casos y dependiendo de la dosis y frecuencia de estas, el perfil llega a ser similar al de la rEPO, ya que se observa una total ausencia de isoformas endógenas. Por tanto el perfil de una muestra positiva puede ó no, tener un contenido de EPO endógena junto con la presencia de las isoformas correspondientes a la EPO exógena. La positividad no solo estará dada por la distribución del perfil sino por la presencia de isoformas con intensidades superiores a las ubicadas en la zona endógena y localizada a un pI superior de 4,5, área donde se observan las isoformas de los patrones de rEPO (alfa, beta, etc). Esta última característica trata de ser definida en el último criterio

de positividad que a su vez introduce la dimensión cuantitativa del resultado, desde el punto de vista de presencia o ausencia del compuesto a detectar (rEPO o NESP).

Todas las muestras de los laboratorios fueron evaluadas de nuevo utilizando estos criterios. La evaluación mejoro significativamente. La inclusión de criterios cualitativos eliminó gran parte de la dispersión observada al utilizar el porcentaje de bandas básicas como criterio de evaluación. Las muestras que fueron invalidadas se caracterizaron por presentar manchas (negras o blancas), falta de resolución entre las bandas y baja o ausencia de sensibilidad. Ninguna muestra blanco fue evaluada como positiva a pesar de contener un perfil caracterizado por un componente de isoformas básicas, mientras utilizando el porcentaje de bandas básicas algunos laboratorios reportaron valores por enzima de 80% de bandas básicas, tal vez debido al perfil característico de la muestra (tendencia a contener más isoformas en la zona básica) y la falta de homogeneidad en el proceso de evaluación. Todas las muestras cargadas con concentraciones superiores a 3 IU/L fueron evaluadas como positivas. Las muestras cargadas con rEPO a 1,5 IU/L demostraron estar dentro del rango del límite de detección del método, definido como el punto donde el método tiene la capacidad para diferenciar rEPO en presencia de EPO endógena. Los resultados próximos a este rango pueden llegar a ser dispersos, como se observó en este caso, el 32% fue evaluado como positivo, mientras el 16% como negativo y más de la mitad de las muestras (52%) fueron excluidas por no cumplir los criterios de aceptación.

La utilización de estos criterios ha dado una evaluación más homogénea sin embargo es imprescindible la evaluación de estos frente a poblaciones que incluyan todo tipo de muestras, además de ser asimilados por otros laboratorios que puedan aportar alguna otra visión al respecto. Estos criterios forman parte de una estrategia preliminar en el campo de la validación del método y como tal deben evolucionar, ser estudiados dentro de un estudio más completo de validación que trate de acercarse más al tipo de ensayo y que además estudie algunas variables más específicas del método.

Esta etapa fue desarrollada en el segundo parte de esta tesis y los resultados se publicaron en dos estudios.

ESTUDIO 2 Y 3.

Las diferentes guías y textos publicados hasta el momento hacen referencia a dos tipos de ensayos o métodos: los métodos cuantitativos y los cualitativos. En el caso de los primeros los parámetros a evaluar están bastante estudiados y existe un consenso de cuáles y cómo se deben estudiar. Mientras que en el caso de los métodos cualitativos este aspecto sufre una situación inversa. Como se describía en la introducción no existe una armonización de los parámetros que se deben estudiar en el caso de ensayos cualitativos, aun más la implementación de nuevas tecnologías de tipo cualitativo con características particulares lleva a un planteamiento mucho más complejo de los parámetros a estudiar en este tipo de ensayos, este es el caso de la metodología empleada para la determinación de rEPO

Aunque algunas de las variables estudiadas en este protocolo siguen los parámetros planteados por las guías internacionales, cabe hacer una mención más amplia en este capítulo de los parámetros que caracterizan este método. Uno de los puntos críticos destacados en la primera fase de la validación intra-laboratorios fue la de clasificar el anticuerpo monoclonal anti-EPO (clon AE7A5), como un reactivo crítico. La identificación de las diferentes isoformas y de los diferentes perfiles de cada una de las especies de EPO y NESP, depende de la especificidad del anticuerpo. En el estudio de validación la especificidad del anticuerpo fue valorada desde dos aspectos, uno la capacidad de diferenciar entre un caso de administración de rEPO o NESP en presencia de la uEPO endógena y el de posibles reacciones cruzadas con otras sustancias bajo las condiciones del método de IEF. Actualmente existen diferentes publicaciones que atribuyen reacciones cruzadas del anticuerpo a otras proteínas encontradas en la orina. Sin embargo, ninguno de los estudios emplea las condiciones empleadas en el método de IEF y no valoran las condiciones normales de excreción de estas proteínas en la orina humana.

El estudio de especificidad demostró que el anticuerpo es específico para la detección de rEPO y NESP siempre que se realice bajo las condiciones descritas en el protocolo normalizado de trabajo y se utilicen los criterios de evaluación establecidos por la AMA. No obstante la controversia en este aspecto es aún punto de discusión en la comunidad científica y es uno de los puntos en los cuales el método puede ser mejorado.

En este aspecto la obtención de anticuerpos dirigidos hacia epítopes específicos de la proteína que permitan la diferenciación entre las especies de EPO es uno de los aspectos en los cuales se puede modificar esta determinación. Dentro del marco de esta tesis se trató de evaluar otros anticuerpos con esta finalidad. Los resultados de este estudio se describen en el tercer estudio.

Los anticuerpos policlonales obtenidos mediante el uso de péptidos con epítopes diferentes de rEPO y de NESP, demostraron ser específicos y útiles en el caso de diferenciar estas dos moléculas. Sin embargo, su falta de sensibilidad en comparación con el anticuerpo monoclonal usado actualmente plantearon una limitante. Esta misma limitante fue observada en el caso de los anticuerpos comerciales.

La posibilidad de utilizar otros anticuerpos debe ser estudiada ampliamente, ya sea para mejorar el método o crear otros métodos de identificación que puedan ser utilizados como métodos de confirmación. Debido a que no existe otro método ni tampoco otro anticuerpo con la misma sensibilidad que el usado actualmente, la AMA ha permitido el uso del mismo método en la etapa de confirmación cuando una muestra es presuntamente sospechosa de la presencia de rEPO o NESP, a pesar de que en sus BPL se describe el uso de otros anticuerpos en la etapa de confirmación.

En cuanto a las otras variables estudiadas uno de los aspectos a mejorar son el porcentaje de recuperación del método. Las fases de purificación se realizan utilizando filtros con un punto de corte próximo al peso molecular de la EPO (30000 Da). Esta situación pudo generar el bajo porcentaje de

recuperación observado en el estudio (60%), como también las pérdidas ocasionadas por la degradación de la proteína o la absorción de esta al filtro. Algunas posibilidades puede ser el uso de otro tipo de filtros con diferentes membranas o la posibilidad de utilizar fases previas de purificación. Esta última opción fue investigada durante el desarrollo de esta tesis. Dos tipos de opciones fueron evaluadas, la creación de columnas de inmunoafinidad (IAC) y de perlas inmunomagnéticas.

La creación de columnas de inmunoafinidad mediante el uso de anticuerpos policlonales o monoclonales generó la presentación de un póster que se adjunta en el anexo 3. Las columnas demostraron que dependían de la selectividad del anticuerpo y esto podía generar en una mayor identificación de algunas isoformas. Adicionalmente, la cantidad purificada era insuficiente para ser utilizada en el método de IEF aún utilizando una gran cantidad de anticuerpo. En el caso de las perlas inmunomagnéticas, no se pudo obtener resultados definitivos, a pesar de utilizar los mismos anticuerpos de las columnas (anticuerpo monoclonal del método de IEF y anticuerpo policlonal anti- EPO de Sigma).

A pesar de observarse un porcentaje de recuperación bajo, el LOD en los retentatos fueron adecuados dentro del rango de concentraciones encontrados en las muestras de orina aunque dependió del número de isoformas que componen el perfil de cada sustancia.

Otra variable estudiada fueron las relacionadas con el sistema de quimioluminiscencia. Los reactivos de quimioluminiscencia en cada protocolo pueden marcar un aumento en la sensibilidad de la técnica. En este protocolo se estudio el tiempo óptimo de exposición y el tiempo cinético. El estudio demostró que la adquisición de imágenes en un rango de trabajo adecuado, permite eliminar del protocolo de cuantificación de EPO en el retentato por ELISA, paso previo que se realiza con el objetivo de ajustar la concentración antes de colocar la muestra en el gel. Esta observación permite disminuir el tiempo de trabajo y el costo económico.

La realización de varias exposiciones en diferentes tiempos dentro del rango de trabajo permite evaluar correctamente las diferentes muestras que se pueden observar en un gel compuesto por muestras con diferentes concentraciones.

Finalmente, una de las variables que algunas guías recomienda evaluar es la estabilidad. Aunque los protocolos propuestos por estas guías son amplios y necesitan estudios a largo plazo, se realizó un estudio preliminar (ver anexo 4). Este estudio fue llevado a cabo utilizando muestras de orinas de sujetos a los cuales se les administro Epoetin beta (Neorecormon[®], 20 IU/kg cada 48h). Después de la recolección a las muestras se les adicionó como estabilizante azida sódica (1%). Las muestras fueron sujetas a 3 ciclos de descongelación y congelación, 4 días a 4°C, a 37°C y a temperatura ambiente. Comparando las imágenes obtenidas, la concentración de EPO parece no estar afectada incluso a condiciones extremas como incubaciones a 37°C.

La presencia de alguna población microbiana que pueda degradar el contenido de EPO y que pudo ser inhibida por la agregación de azida sódica, puede no simular las condiciones reales en que las muestras de *doping* son realizadas. Sin embargo, cabe aclarar que siguiendo las recomendaciones de la AMA, cuando una orina posee un perfil “inestable” es considerada no valida. La recolección de una muestra con esta característica es inevitable. En tales caso las condiciones de almacenamiento y transporte serán importantes en el momento de evaluar la muestra.

La metodología descrita por la AMA, en el caso de sospecha de un presunto caso positivo, es la de evaluar la muestra una segunda vez siguiendo el mismo protocolo y además evaluando la estabilidad de la muestra mediante la aplicación del protocolo de estabilidad. Este protocolo consiste en la adición rEPO y NESP a la orina a evaluar. Si los perfiles de las sustancias recombinantes son alterados, la orina es considerada “inestable”. Son necesarios futuros estudios en este campo utilizando muestras reales y protocolos con un mayor número de condiciones y a largo plazos para confirmar estos datos.

ESTUDIO 4.

La aparición de las muestras denominadas “atípicas” es decir, muestras que presentan un perfil caracterizado por un desplazamiento de las isoformas endógenas hacia la zona recombinante y la aparición de muestras caracterizadas por perfiles que no coincidían con ningún patrón y que cambiaban con el tiempo el perfil de IEF (muestras denominadas “inestables”) llevaron a estudiar que factores podían afectar la distribución de las isoformas.

Partiendo de la hipótesis de que el origen de la heterogeneidad de los perfiles observados en los geles de IEF radica en la glicosilación, el estudio se centró en estudiar aquellas modificaciones translacionales que pueden conferir cargas. Una de las principales cargas es el ácido siálico, si contamos el número total de ácidos siálicos posibles en el caso de la rEPO, observamos que el máximo de residuos puede ser de 14, mientras en el caso del NESP es de 22, debido a los dos cadenas adicionales de tipo N que posee. Estudios de espectrometría de masas revelaron una diferencia de ~3,2 kDa cuando la rEPO es sometida a una desialización química, indicando que la media de ácidos siálicos es de 11 para este compuesto y que la isoforma más ácida en un gel de IEF corresponde a un cálculo de 14 ácidos siálicos. Si la rEPO y la uEPO tienen el mismo número de cadenas glicosiladas, la uEPO debe contener cargas adicionales que le confieran poseer más isoformas ácidas.

Dentro del grupo de cargas que pueden ser evaluadas se encuentran los residuos de tipo fosfatos unidos a serina, treonina o tirosina, grupos glucorónidos o residuos de tipo sulfato. Los dos primeros grupos fueron evaluados utilizando digestiones enzimáticas, en ambos casos no se observó ningún cambio. Sin embargo, en el caso de las digestiones enzimáticas realizadas con diferentes aril sulfatasa demostraron ser similares entre ellos exceptuando el caso de la aril sulfatasa obtenida a partir de *Helix pomatia*. En este caso se observó un desplazamiento hacia las zonas básicas de forma más marcada en el caso de rEPO y NESP que uEPO. Los perfiles

observados fueron semejantes a los encontrados en el caso de las orinas “inestables”.

La preparación de la enzima no es un producto purificado de la enzima, por lo tanto, la única observación que se puede concluir es la posible presencia de una actividad de tipo sialidasa dirigida a los enlaces de tipo α -2,3 presentes en las proteínas recombinantes obtenidas en células CHO.

Las digestiones realizadas con la enzima sialidasa resultaron en el corrimiento de las isoformas que se observaron cuando las digestiones fueron parciales; mientras que cuando fueron totales estas desaparecieron del gel, en el caso de los productos recombinantes. En el caso de la uEPO aún se observaban isoformas en la zona básica, en ambos tipos de digestiones. Los perfiles observados en el caso NESP utilizando una digestión parcial eran similares a los observados en las orinas “inestables”. En esta etapa del estudio fue necesario elaborar geles con un rango de pI más amplio al utilizado en los geles de *doping* (pI 2-6). Se realizaron geles con un rango de pI de 2-9.

En ellos se pudo confirmar que en el caso de la uEPO persistían las isoformas básicas después de un tratamiento químico de desialización y que el perfil obtenido tras la digestión enzimática era compatible con este, confirmándose la hipótesis inicial, es decir, la uEPO contiene otras cargas diferentes a los ácidos siálicos y estas probablemente se encuentran en las cadenas de azúcares.

Para confirmar este razonamiento, se realizaron digestiones que permitieran eliminar las cadenas de tipo N, seguidas de la eliminación de los ácidos siálicos de las cadenas de tipo O. En todas las EPO se observó un desplazamiento hacia pI básicos, todas presentaron una heterogeneidad de por lo menos 3 isoformas. La uEPO y la rEPO presentaron perfiles similares mientras en el caso del NESP las isoformas mantuvieron un pI un poco menos básico, posiblemente ocasionados por los dos residuos adicionales de

ácido aspártico que posee. Los resultados comprobaron que las cargas adicionales de la uEPO se encuentran en los azúcares unidos a las cadenas de tipo N.

La similitud observada con los perfiles de orinas “inestables” con las digestiones realizadas con la aril sulfatasa y la sialidasa plantearon la posibilidad de utilizar los protocolos de trabajo descritos como protocolos opcionales en la identificación de rEPO y sustancia análogas (NESP) en el control antidopaje.

La presencia de muestras “inestables” y su similitud con los resultados observados llevo a plantear la posibilidad de realizar estudios que inhibieran esta actividad utilizando ensayos competitivos con los sustratos específicos de las enzimas donde se observaron resultados similares (p-nitrocatecol sulfato o α -2-3/6- sialil-lactosa). Se observó una inhibición del efecto de la enzima y de la actividad presente en orinas “inestables” al utilizar el sustrato específico de la enzima aril sulfatasa. Igualmente, los perfiles obtenidos tras la digestión enzimática de la aril sulfatasa y de la orina “inestable” fueron similar. Ambas evidencias sugieren que las orinas “inestables” contienen una actividad similar a la observada en el caso de la enzima aril sulfatasa y/o a la actividad sialidasa.

Cabe destacar que en el caso de la uEPO, ni la digestión enzimática con la enzima aril sulfatasa, ni el tratamiento con las orinas “inestables” produjo un cambio en el perfil. La única observación a este hecho es que la actividad presente en las orinas “inestables” evaluadas en este estudio tienen un comportamiento similar al observado en el caso de la aril sulfatasa. Estudios adicionales con un mayor número de muestras de orina “inestable” deben ser llevados a cabo con el objetivo de descartar otras posibles causas de esta actividad, como la presencia de enzimas, germenés a nivel microbiológico y/o sus productos que puedan ocasionar alteraciones a este tipo de proteínas en la orina humana.

CAPÍTULO 9

CONCLUSIONES

ESTUDIO 1.

Se estableció un protocolo normalizado de trabajo para la metodología empleada para la detección de rEPO y análogos.

Se clasificó el uso de algunos reactivos como críticos, es decir que se debe usar el mismo proveedor en todos los casos, por ejemplo el anticuerpo primario monoclonal anti-EPO.

El método ha demostrado requerir un entrenamiento exhaustivo y ser dependiente de la experiencia del operador.

El material de referencia seleccionado fue Erythropoietin BRP (E1515000) producida por la Comisión Europea de la Farmacopea.

La mayor fuente de variación en el método es la sensibilidad, ocasionada por los artefactos electroforéticos en las múltiples etapas del procedimiento que conlleva a dificultades en el momento de la evaluación.

Los resultados son más reproducibles cuando una muestra presenta un *ratio* elevado. Como consecuencia una muestra positiva en el método de cribado será mas reproducible en la confirmación y en el contra-análisis.

El criterio de positividad, porcentaje de bandas básicas, demostró ser insuficiente. Los criterios de calidad desarrollados en este trabajo fueron incluidos dentro del protocolo de evaluación descrito por la AMA.

La evaluación debe estar realizada utilizando los criterios de calidad y de identificación conjuntamente.

ESTUDIO 2 Y 3.

El uso del anticuerpo monoclonal anti-EPO determina la especificidad del método. Bajo las condiciones de IEF el anticuerpo demostró no presentar reacciones cruzadas con las proteínas evaluadas.

El uso de otros anticuerpos se vió limitado por la sensibilidad de estos en comparación al anticuerpo monoclonal usado en el método. Sin embargo, pueden ser una herramienta útil en el caso de poseer diferentes tipos de especificidad.

Diferentes tiempos de exposición pueden ser usados de forma que se pueda obtener una resolución óptima sin afectar la especificidad.

El LOD del método mostró ser adecuado dentro del rango de concentración de EPO en la orina humana.

La optimización en los tiempos de lectura y el estudio de la cinética ha permitido suprimir el ajuste de la concentración a usar mediante la realización de la técnica de ELISA.

ESTUDIO 4.

Se ha demostrado que la uEPO en comparación con la rEPO y el NESP contiene cargas adicionales localizadas en las cadenas de tipo N.

Los protocolos de digestión enzimática utilizando la enzima sialidasa pueden ser utilizados en el control antidopaje. La realización de esta digestión en

muestras sospechosas produce la desaparición de isoformas en el carril, usando geles con un rango de pI de 2-6.

La actividad observada en algunas orinas “inestables” puede estar causada por una actividad de tipo sialidasa similar a la observada en la enzima aril sulfatasa de *H. pomatia*.

El uso de la enzima aril sulfatasa o de los protocolos de inhibición utilizando los sustratos de esta enzima o de la sialidasa pueden ser utilizados en el campo del control antidopaje

CAPÍTULO 10

BIBLIOGRAFIA

1. Abbott,A. (2000) What price the Olympian ideal? *Nature*, **407**, 124-127.
2. Annable,L., Cotes,P.M., & Mussett,M.V. (1972) The second international reference preparation of erythropoietin, human, urinary, for bioassay. *Bull.World Health Organ*, **47**, 99-112.
3. Audran,M., Gareau,R., Matecki,S., Durand,F., Chenard,C., Sicart,M.T., Marion,B., & Bressolle,F. (1999) Effects of erythropoietin administration in training athletes and possible indirect detection in doping control. *Med.Sci.Sports Exerc.*, **31**, 639-645.
4. Ayala-Diaz,R., Galán Álvarez,P., & Martínez López,J. (2001) Hematopoyesis. Eritropoyesis. Fidiopatología eritroide. *Medicine*, **8**, 2613-2620.
5. Barbone,F.P., Johnson,D.L., Farrell,F.X., Collins,A., Middleton,S.A., McMahon,F.J., Tullai,J., & Jolliffe,L.K. (1999) New epoetin molecules and novel therapeutic approaches. *Nephrol.Dial.Transplant.*, **14 Suppl 2**, 80-84.
6. Behr-Gross,M.E., Daas,A., & Bristow,A.F. (2004) Collaborative study for the establishment of erythropoietin BRP batch 2. *Pharmeuropa.Bio*, **2004**, 23-33.
7. Berglund,B. (1992) High-altitude training. Aspects of haematological adaptation. *Sports Med.*, **14**, 289-303.
8. Berglund,B., Birgegard,G., & Hemmingsson,P. (1988) Serum erythropoietin in cross-country skiers. *Med.Sci.Sports Exerc.*, **20**, 208-209.
9. Bert,P. (1882) Sur la richesse en hémoglobine du sang des animaux vivant sur les hauts lieux. *C.R.Acad Sci Paris*, **94**, 805-807.
10. Beru,N., McDonald,J., Lacombe,C., & Goldwasser,E. (1986) Expression of the erythropoietin gene. *Mol.Cell Biol.*, **6**, 2571-2575.

11. Biazzo,D.E., Motamedi,H., Mark,D.F., & Qureshi,S.A. (2000) A high-throughput assay to identify compounds that can induce dimerization of the erythropoietin receptor. *Anal.Biochem.*, **278**, 39-45.
12. Bonsdorff,E. & Jalavisto,E. (1948) A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Acta Physiol Scand*, **16**, 150-170.
13. Breymann,C. (2000) Erythropoietin test methods. *Baillieres Best.Pract.Res.Clin Endocrinol.Metab*, **14**, 135-145.
14. Buemi,M., Aloisi,C., Cavallaro,E., Corica,F., Floccari,F., Grasso,G., Lasco,A., Pettinato,G., Ruello,A., Sturiale,A., & Frisina,N. (2002a) Recombinant human erythropoietin (rHuEPO): more than just the correction of uremic anemia. *J.Nephrol.*, **15**, 97-103.
15. Carnot,P. & Deflandre,C. (1906) Sur l'activité hémopoïétique du sérum au cours de la régénération du sang. *C.R.Acad Sci Paris*, **143**, 384-386.
16. Casadevall,N. (2002) Antibodies against rHuEPO: native and recombinant. *Nephrol.Dial.Transplant.*, **17 Suppl 5**, 42-47.
17. Casadevall,N., Nataf,J., Viron,B., Kolta,A., Kiladjian,J.J., Martin-Dupont,P., Michaud,P., Papo,T., Ugo,V., Teyssandier,I., Varet,B., & Mayeux,P. (2002) Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N.Engl.J Med.*, **346**, 469-475.
18. Casajús Mallén,J.A. (2005) Dopaje, salud y deporte. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, **29**, 1-11.
19. Chapel,S., Veng-Pedersen,P., Hohl,R.J., Schmidt,R.L., McGuire,E.M., & Widness,J.A. (2001) Changes in erythropoietin pharmacokinetics following busulfan-induced bone marrow ablation in sheep: evidence for bone marrow as a major erythropoietin elimination pathway. *J Pharmacol.Exp.Ther.*, **298**, 820-824.
20. Cheung,W.K., Goon,B.L., Guilfoyle,M.C., & Wacholtz,M.C. (1998) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin after single and multiple subcutaneous doses to healthy subjects. *Clin.Pharmacol.Ther.*, **64**, 412-423.

21. Choi,B.H., Ha,Y., Ahn,C.H., Huang,X., Kim,J.M., Park,S.R., Park,H., Park,H.C., Kim,S.W., & Lee,M. (2007) A hypoxia-inducible gene expression system using erythropoietin 3' untranslated region for the gene therapy of rat spinal cord injury. *Neurosci.Lett.*, **412**, 118-122.
22. Choi,D., Kim,M., & Park,J. (1996) Erythropoietin: physico- and biochemical analysis. *J Chromatogr.B Biomed.Appl.*, **687**, 189-199.
23. Cointe,D., Beliard,R., Jorieux,S., Leroy,Y., Glacet,A., Verbert,A., Bourel,D., & Chirat,F. (2000) Unusual N-glycosylation of a recombinant human erythropoietin expressed in a human lymphoblastoid cell line does not alter its biological properties. *Glycobiology*, **10**, 511-519.
24. Cotes,P.M. & Bangham,D.R. (1966) The international reference preparation of erythropoietin. *Bull.World Health Organ*, **35**, 751-760.
25. Court of Arbitration for Sports. CAS 2002/A/374 Muehlegg v/IOC. Revisado el: 11-1-2007. Disponible en: <http://www.tas-cas.org/en/pdf/juris2.pdf>
26. de la Chapelle A., Traskelin,A.L., & Juvonen,E. (1993) Truncated erythropoietin receptor causes dominantly inherited benign human erythrocytosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **90**, 4495-4499.
27. De,P., V, Guglielmini,C., Casoni,I., Vedovato,M., Gilli,P., Farinelli,A., Salvatorelli,G., & Conconi,F. (1988) Serum erythropoietin in cross-country skiers. *Int.J.Sports Med.*, **9**, 99-101.
28. Deicher,R. & Horl,W.H. (2004) Differentiating factors between erythropoiesis-stimulating agents: a guide to selection for anaemia of chronic kidney disease. *Drugs*, **64**, 499-509.
29. Eckardt,K.U. & Kurtz,A. (2005) Regulation of erythropoietin production. *Eur.J.Clin.Invest*, **35 Suppl 3**, 13-19.
30. Egrie J.C., Dwyer E., Lykos M., Hitz A., & Brown J.K. (1997) Novel erythropoiesis stimulating protein (NESP) has a longer serum half-life and greater in vivo biological activity compared to recombinant human erythropoietin (rHuEPO) Abstract. *Blood*, **90**, 56a.

31. Elliott,S., Egrie,J., Browne,J., Lorenzini,T., Busse,L., Rogers,N., & Ponting,I. (2004) Control of rHuEPO biological activity: the role of carbohydrate. *Exp.Hematol.*, **32**, 1146-1155.
32. Ershler,W.B., Sheng,S., McKelvey,J., Artz,A.S., Denduluri,N., Tecson,J., Taub,D.D., Brant,L.J., Ferrucci,L., & Longo,D.L. (2005) Serum erythropoietin and aging: a longitudinal analysis. *J.Am.Geriatr.Soc.*, **53**, 1360-1365.
33. Erslev,A.J. (1953) Humoral regulation of red cell production. *Blood*, **8**, 349-357.
34. Eschbach,J.W., Egrie,J.C., Downing,M.R., Browne,J.K., & Adamson,J.W. (1987) Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *N.Engl.J.Med.*, **316**, 73-78.
35. Espada,J. & Gutnisky,A. (1970) [Purification of human urinary erythropoietin]. *Acta Physiol Lat.Am.*, **20**, 122-129.
36. Fandrey,J. (2004) Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, **286**, R977-R988.
37. Fisher,J.W. (2003) Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp.Biol.Med.(Maywood.)*, **228**, 1-14.
38. Foresta,C., Mioni,R., Bordon,P., Miotto,D., Montini,G., & Varotto,A. (1994) Erythropoietin stimulates testosterone production in man. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **78**, 753-756.
39. Fried,W. (1995) Erythropoietin. *Annu.Rev Nutr.*, **15**, 353-377.
40. Fukuda,M.N., Sasaki,H., Lopez,L., & Fukuda,M. (1989) Survival of recombinant erythropoietin in the circulation: the role of carbohydrates. *Blood*, **73**, 84-89.
41. Furukawa,K. & Kobata,A. (1992) Protein glycosylation. *Curr.Opin.Biotechnol.*, **3**, 554-559.
42. Gareau,R., Audran,M., Baynes,R.D., Flowers,C.H., Duvallet,A., Senecal,L., & Brisson,G.R. (1996) Erythropoietin abuse in athletes. *Nature*, **380**, 113.

43. Genc,S., Koroglu,T.F., & Genc,K. (2004) Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res.*, **1000**, 19-31.
44. Goldberg,M.A., Dunning,S.P., & Bunn,H.F. (1988) Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*, **242**, 1412-1415.
45. Goochee,C.F., Gramer,M.J., Andersen,D.C., Bahr,J.B., & Rasmussen,J.R. (1991) The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factors affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. *Biotechnology (N. Y.)*, **9**, 1347-1355.
46. Grabenhorst,E., Schlenke,P., Pohl,S., Nimtz,M., & Conradt,H.S. (1999) Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. *Glycoconj.J.*, **16**, 81-97.
47. Gross,A.W. & Lodish,H.F. (2006) Cellular trafficking and degradation of erythropoietin and novel erythropoiesis stimulating protein (NESP). *J.Biol.Chem.*, **281**, 2024-2032.
48. Grunenfelder,C. (1996) Circadian periodicity of serum erythropoietins. A study of 6 healthy subjects. *Schweiz.Rundsch.Med.Prax.*, **85**, 1283-1293.
49. Hokke,C.H., Bergwerff,A.A., van Dedem,G.W., Kamerling,J.P., & Vliegenthart,J.F. (1995) Structural analysis of the sialylated N- and O-linked carbohydrate chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. Sialylation patterns and branch location of dimeric N-acetyllactosamine units. *Eur.J.Biochem.*, **228**, 981-1008.
50. Hokke,C.H., Bergwerff,A.A., van Dedem,G.W., van Oostrum,J., Kamerling,J.P., & Vliegenthart,J.F. (1990) Sialylated carbohydrate chains of recombinant human glycoproteins expressed in Chinese hamster ovary cells contain traces of N-glycolylneuraminic acid. *FEBS Lett.*, **275**, 9-14.
51. Imai,N., Higuchi,M., Kawamura,A., Tomonoh,K., Oh-Eda,M., Fujiwara,M., Shimonaka,Y., & Ochi,N. (1990) Physicochemical and biological characterization of asialoerythropoietin. Suppressive effects of sialic acid in the expression of biological activity of human erythropoietin in vitro. *Eur.J.Biochem.*, **194**, 457-462.

52. Inoue,N., Takeuchi,M., Asano,K., Shimizu,R., Takasaki,S., & Kobata,A. (1993) Structures of mucin-type sugar chains on human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. *Arch.Biochem.Biophys.*, **301**, 375-378.

53. International Olympic Committee. The fight against doping and promotion of athletes' health. Revisado el: 31-1-2007. Disponible en: http://multimedia.olympic.org/pdf/en_report_838.pdf

54. International Olympic Committee. The Olympic Games in Ancient Greece. Revisado el: 31-1-2007. Disponible en: http://multimedia.olympic.org/pdf/en_reports_658.pdf

55. Jacobs,K., Shoemaker,C., Rudersdorf,R., Neill,S.D., Kaufman,R.J., Mufson,A., Seehra,J., Jones,S.S., Hewick,R., Fritsch,E.F., & . (1985) Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*, **313**, 806-810.

56. Jelkmann,W. (2002) The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin (Epo) in view of the pharmacokinetics of the recombinant drugs rhEpo and NESP. *Eur J Haematol.*, **69**, 265-274.

57. Jelkmann,W. (2004) Molecular biology of erythropoietin. *Intern.Med.*, **43**, 649-659.

58. Kamerling,J.P. (1996) Carbohydrate features of recombinant human glycoproteins. *Biotechnologia Aplicada*, **13**, 167-180.

59. Kampf,D., Kahl,A., Passlick,J., Pustelnik,A., Eckardt,K.U., Ehmer,B., Jacobs,C., Baumelou,A., Grabensee,B., & Gahl,G.M. (1989) Single-dose kinetics of recombinant human erythropoietin after intravenous, subcutaneous and intraperitoneal administration. Preliminary results. *Contrib.Nephrol.*, **76**, 106-110.

60. Kato M, Kato Y, & Sugiyama Yuichi (1999) Mechanism of upregulation of erythropoietin-induced uptake clearance by the spleen. *The American Physiological Society*, 887-895.

61. Kausz,A.T., Watkins,S.L., Hansen,C., Godwin,D.A., Palmer,R.B., & Brandt,J.R. (1999) Intraperitoneal erythropoietin in children on peritoneal dialysis: A study of pharmacokinetics and efficacy. *Am.J.Kidney Dis.*, **34**, 651-656.

62. Kawasaki,N., Haishima,Y., Ohta,M., Itoh,S., Hyuga,M., Hyuga,S., & Hayakawa,T. (2001) Structural analysis of sulfated N-linked oligosaccharides in erythropoietin. *Glycobiology*, **11**, 1043-1049.
63. Kazlauskas,R., Howe,C., & Trout,G. (2002) Strategies for rhEPO detection in sport. *Clin.J Sport Med.*, **12**, 229-235.
64. Kendall,R.G. (2001) Erythropoietin. *Clin.Lab Haematol.*, **23**, 71-80.
65. Kindler,J., Eckardt,K.U., Ehmer,B., Jandeleit,K., Kurtz,A., Schreiber,A., Scigalla,P., & Sieberth,H.G. (1989) Single-dose pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin in patients with various degrees of renal failure. *Nephrol.Dial.Transplant.*, **4**, 345-349.
66. Klausen,T., Poulsen,T.D., Fogh-Andersen,N., Richalet,J.P., Nielsen,O.J., & Olsen,N.V. (1996) Diurnal variations of serum erythropoietin at sea level and altitude. *Eur J Appl.Physiol Occup.Physiol*, **72**, 297-302.
67. Kochendoerfer,G.G., Chen,S.Y., Mao,F., Cressman,S., Traviglia,S., Shao,H., Hunter,C.L., Low,D.W., Cagle,E.N., Carnevali,M., Gueriguian,V., Keogh,P.J., Porter,H., Stratton,S.M., Wiedeke,M.C., Wilken,J., Tang,J., Levy,J.J., Miranda,L.P., Crnogorac,M.M., Kalbag,S., Botti,P., Schindler-Horvat,J., Savatski,L., Adamson,J.W., Kung,A., Kent,S.B., & Bradburne,J.A. (2003) Design and chemical synthesis of a homogeneous polymer-modified erythropoiesis protein. *Science*, **299**, 884-887.
68. Koury,M.J. (2005) Erythropoietin: the story of hypoxia and a finely regulated hematopoietic hormone. *Exp.Hematol.*, **33**, 1263-1270.
69. Koury,S.T., Bondurant,M.C., & Koury,M.J. (1988) Localization of erythropoietin synthesizing cells in murine kidneys by in situ hybridization. *Blood*, **71**, 524-527.
70. Koury,S.T., Bondurant,M.C., Koury,M.J., & Semenza,G.L. (1991) Localization of cells producing erythropoietin in murine liver by in situ hybridization. *Blood*, **77**, 2497-2503.
71. Kralovics,R., Indrak,K., Stopka,T., Berman,B.W., Prchal,J.F., & Prchal,J.T. (1997) Two new EPO receptor mutations: truncated EPO receptors are most frequently associated with primary familial and congenital polycythemia. *Blood*, **90**, 2057-2061.

72. Krzyzanski,W., Jusko,W.J., Wacholtz,M.C., Minton,N., & Cheung,W.K. (2005) Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of recombinant human erythropoietin after multiple subcutaneous doses in healthy subjects. *Eur.J.Pharm.Sci.*, **26**, 295-306.
73. Lacombe,C., Da Silva,J.L., Bruneval,P., Fournier,J.G., Wendling,F., Casadevall,N., Camilleri,J.P., Bariety,J., Varet,B., & Tambourin,P. (1988) Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J.Clin.Invest*, **81**, 620-623.
74. Lacombe,C. & Mayeux,P. (1998) Biology of erythropoietin. *Haematologica*, **83**, 724-732.
75. Lai,P.H., Everett,R., Wang,F.F., Arakawa,T., & Goldwasser,E. (1986) Structural characterization of human erythropoietin. *J.Biol.Chem.*, **261**, 3116-3121.
76. Lasne,F. & de Ceaurriz,J. (2000) Recombinant erythropoietin in urine. *Nature*, **405**, 635.
77. Lasne,F., Martin,L., Crepin,N., & de Ceaurriz,J. (2002) Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones. *Anal.Biochem.*, **311**, 119-126.
78. Lin,F.K., Suggs,S., Lin,C.H., Browne,J.K., Smalling,R., Egrie,J.C., Chen,K.K., Fox,G.M., Martin,F., Stabinsky,Z., & . (1985) Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **82**, 7580-7584.
79. Linsley,K.B., Chan,S.Y., Chan,S., Reinhold,B.B., Lisi,P.J., & Reinhold,V.N. (1994a) Applications of electrospray mass spectrometry to erythropoietin N- and O-linked glycans. *Anal.Biochem.*, **219**, 207-217.
80. Linsley,K.B., Chan,S.Y., Chan,S., Reinhold,B.B., Lisi,P.J., & Reinhold,V.N. (1994) Applications of electrospray mass spectrometry to erythropoietin N- and O-linked glycans. *Anal.Biochem.*, **219**, 207-217.
81. Lippi,G. & Banfi,G. (2006) Blood transfusions in athletes. Old dogmas, new tricks. *Clin.Chem.Lab Med.*, **44**, 1395-1402.

82. Lippi,G., Franchini,M., Salvagno,G.L., & Guidi,G.C. (2006) Biochemistry, physiology, and complications of blood doping: facts and speculation. *Crit Rev.Clin.Lab Sci.*, **43**, 349-391.
83. Lippin,Y., Dranitzki-Elhalel,M., Brill-Almon,E., Mei-Zahav,C., Mizrachi,S., Liberman,Y., Iaina,A., Kaplan,E., Podjarny,E., Zeira,E., Harati,M., Casadevall,N., Shani,N., & Galun,E. (2005) Human erythropoietin gene therapy for patients with chronic renal failure. *Blood*.
84. López Calbet,J.A. (2006) Fisiología de la altitud y ejercicio físico. Fisiología del Ejercicio (ed. by López Chicharro J & A. Fernández Vaquero), Editorial Médica Panamericana, S.A., Buenos Aires, 696-737.
85. Loya,F., Yang,Y., Lin,H., Goldwasser,E., & Albitar,M. (1994) Transgenic mice carrying the erythropoietin gene promoter linked to lacZ express the reporter in proximal convoluted tubule cells after hypoxia. *Blood*, **84**, 1831-1836.
86. Macdougall,I.C. (2005) CERA (Continuous Erythropoietin Receptor Activator): a new erythropoiesis-stimulating agent for the treatment of anemia. *Curr.Hematol.Rep.*, **4**, 436-440.
87. Macdougall,I.C., Gray,S.J., Elston,O., Breen,C., Jenkins,B., Browne,J., & Egrie,J. (1999) Pharmacokinetics of novel erythropoiesis stimulating protein compared with epoetin alfa in dialysis patients. *J.Am.Soc.Nephrol.*, **10**, 2392-2395.
88. Macdougall,I.C., Hutton,R.D., Cavill,I., Coles,G.A., & Williams,J.D. (1990) Treating renal anaemia with recombinant human erythropoietin: practical guidelines and a clinical algorithm. *BMJ*, **300**, 655-659.
89. Macdougall,I.C., Roberts,D.E., Coles,G.A., & Williams,J.D. (1991) Clinical pharmacokinetics of epoetin (recombinant human erythropoietin). *Clin.Pharmacokinet.*, **20**, 99-113.
90. Macdougall,I.C., Roberts,D.E., Neubert,P., Dharmasena,A.D., Coles,G.A., & Williams,J.D. (1989) Pharmacokinetics of intravenous, intraperitoneal, and subcutaneous recombinant erythropoietin in patients on CAPD. A rationale for treatment. *Contrib.Nephrol.*, **76**, 112-120.

91. Madan,A., Lin,C., Hatch,S.L., & Curtin,P.T. (1995) Regulated basal, inducible, and tissue-specific human erythropoietin gene expression in transgenic mice requires multiple cis DNA sequences. *Blood*, **85**, 2735-2741.
92. Maiese,K., Li,F., & Chong,Z.Z. (2005) New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA*, **293**, 90-95.
93. Marsden,J.T. (2006) Erythropoietin measurement and clinical applications. *Ann.Clin.Biochem.*, **43**, 97-104.
94. Masuda,S., Kobayashi,T., Chikuma,M., Nagao,M., & Sasaki,R. (2000) The oviduct produces erythropoietin in an estrogen- and oxygen-dependent manner. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, **278**, E1038-E1044.
95. Matsumoto,S., Ikura,K., Ueda,M., & Sasaki,R. (1995) Characterization of a human glycoprotein (erythropoietin) produced in cultured tobacco cells. *Plant Mol.Biol.*, **27**, 1163-1172.
96. Maxwell,A.P., Lappin,T.R., Johnston,C.F., Bridges,J.M., & McGeown,M.G. (1990) Erythropoietin production in kidney tubular cells. *Br.J.Haematol.*, **74**, 535-539.
97. Maxwell,P.H., Ferguson,D.J., Osmond,M.K., Pugh,C.W., Heryet,A., Doe,B.G., Johnson,M.H., & Ratcliffe,P.J. (1994) Expression of a homologously recombined erythropoietin-SV40 T antigen fusion gene in mouse liver: evidence for erythropoietin production by Ito cells. *Blood*, **84**, 1823-1830.
98. Misaizu,T., Matsuki,S., Strickland,T.W., Takeuchi,M., Kobata,A., & Takasaki,S. (1995) Role of antennary structure of N-linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin. *Blood*, **86**, 4097-4104.
99. Miyake,T., Kung,C.K., & Goldwasser,E. (1977) Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem.*, **252**, 5558-5564.
100. Moritz,K.M., Lim,G.B., & Wintour,E.M. (1997) Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *Am.J.Physiol*, **273**, R1829-R1844.
101. Mujais,S.K., Beru,N., Pullman,T.N., & Goldwasser,E. (1999) Erythropoietin is produced by tubular cells of the rat kidney. *Cell Biochem.Biophys.*, **30**, 153-166.

102. Neumayer,H.H., Brockmoller,J., Fritschka,E., Roots,I., Scigalla,P., & Wattenberg,M. (1989) Pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin after SC administration and in long-term IV treatment in patients on maintenance hemodialysis. *Contrib.Nephrol.*, **76**, 131-141.
103. Nimtz,M., Martin,W., Wray,V., Kloppel,K.D., Augustin,J., & Conradt,H.S. (1993) Structures of sialylated oligosaccharides of human erythropoietin expressed in recombinant BHK-21 cells. *Eur J Biochem.*, **213**, 39-56.
104. Ohta,M., Kawasaki,N., Itoh,S., & Hayakawa,T. (2002) Usefulness of glycopeptide mapping by liquid chromatography/mass spectrometry in comparability assessment of glycoprotein products. *Biologicals*, **30**, 235-244.
105. Osborne,W.R., Ramesh,N., Lau,S., Clowes,M.M., Dale,D.C., & Clowes,A.W. (1995) Gene therapy for long-term expression of erythropoietin in rats. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **92**, 8055-8058.
106. Pace,N. (1947) The increase in hypoxia tolerance of normal men accompanying the polycythemia induced by transfusion of erythrocytes. *Am.J Physiol*, **148**, 152-163.
107. Parisotto,R., Gore,C.J., Emslie,K.R., Ashenden,M.J., Brugnara,C., Howe,C., Martin,D.T., Trout,G.J., & Hahn,A.G. (2000) A novel method utilising markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica*, **85**, 564-572.
108. Pasqualetti,P. & Casale,R. (1997) No influence of aging on the circadian rhythm of erythropoietin in healthy subjects. *Gerontology*, **43**, 206-209.
109. Pérez Ruiz,M. (2006) Serie Roja. Fisiología del Ejercicio (ed. by López Chicharro J & A. Fernández Vaquero), Editorial Médica Panamericana, S.A., Buenos Aires, 281-94.
110. Pratt,R. (2006) Epoetin delta, erythropoietin produced by a human cell line, is effective in the treatment of renal anaemia. *Poster presented at 11th Congress of European Hematology, 15-18 June, Amsterdam, Holland, 0576.*
111. Rahbek-Nielsen,H., Roepstorff,P., Reischl,H., Wozny,M., Koll,H., & Haselbeck,A. (1997) Glycopeptide profiling of human urinary erythropoietin by matrix- assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom.*, **32**, 948-958.

112. Ramakrishnan,R., Cheung,W.K., Wacholtz,M.C., Minton,N., & Jusko,W.J. (2004) Pharmacokinetic and pharmacodynamic modeling of recombinant human erythropoietin after single and multiple doses in healthy volunteers. *J.Clin.Pharmacol.*, **44**, 991-1002.
113. Reddingius,R.E., de Boer,A.W., Schroder,C.H., Willems,J.L., & Monnens,L.A. (1997) Increase of the bioavailability of intraperitoneal erythropoietin in children on peritoneal dialysis by administration in small dialysis bags. *Perit.Dial.Int.*, **17**, 467-470.
114. Reddingius,R.E., Schroder,C.H., Koster,A.M., & Monnens,L.A. (1994) Pharmacokinetics of recombinant human erythropoietin in children treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Eur.J.Pediatr.*, **153**, 850-854.
115. Reissmann,K.R. (1950) Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blood*, **5**, 372-380.
116. Rivera,V.M., Gao,G.P., Grant,R.L., Schnell,M.A., Zoltick,P.W., Rozamus,L.W., Clackson,T., & Wilson,J.M. (2005) Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood*, **105**, 1424-1430.
117. Rush,R.S., Derby,P.L., Smith,D.M., Merry,C., Rogers,G., Rohde,M.F., & Katta,V. (1995) Microheterogeneity of erythropoietin carbohydrate structure. *Anal.Chem.*, **67**, 1442-1452.
118. Sasaki,H., Bothner,B., Dell,A., & Fukuda,M. (1987) Carbohydrate structure of erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells by a human erythropoietin cDNA. *J Biol.Chem.*, **262**, 12059-12076.
119. Sasaki,R., Masuda,S., & Nagao,M. (2000) Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Biosci.Biotechnol.Biochem.*, **64**, 1775-1793.
120. Schroder,C.H., Swinkels,L.M., Reddingius,R.E., Sweep,F.G., Willems,H.L., & Monnens,L.A. (2001) Adsorption of erythropoietin and growth hormone to peritoneal dialysis bags and tubing. *Perit.Dial.Int.*, **21**, 90-92.

121. Schuster,S.J., Badiavas,E.V., Costa-Giomi,P., Weinmann,R., Erslev,A.J., & Caro,J. (1989) Stimulation of erythropoietin gene transcription during hypoxia and cobalt exposure. *Blood*, **73**, 13-16.
122. Shahrokh,Z., Flatman,S., Davies,M., Baycroft,A., & Heartlein,M. (2006) Erythropoietin produced by a human cells line has only trace levels of potentially immunogenic n-glycolylneuraminic acid residues. *Poster presented at 11th Congress of European Hematology, 15-18 June, Amsterdam, Holland, 0562.*
123. Sherwood,J.B. & Goldwasser,E. (1979) A radioimmunoassay for erythropoietin. *Blood*, **54**, 885-893.
124. Skibeli,V., Nissen-Lie,G., & Torjesen,P. (2001) Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin. *Blood*, **98**, 3626-3634.
125. Sola,A., Wen,T.C., Hamrick,S.E., & Ferriero,D.M. (2005) Potential for protection and repair following injury to the developing brain: a role for erythropoietin? *Pediatr.Res.*, **57**, 110R-117R.
126. Souillard,A., Audran,M., Bressolle,F., Gareau,R., Duvallet,A., & Chanal,J.L. (1996) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human erythropoietin in athletes. Blood sampling and doping control. *Br.J Clin.Pharmacol.*, **42**, 355-364.
127. Spivak,J.L. & Hogans,B.B. (1989a) The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. *Blood*, **73**, 90-99.
128. Spivak,J.L. & Hogans,B.B. (1989b) The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. *Blood*, **73**, 90-99.
129. Storing,P.L. & Gaines Das,R.E. (1992) The International Standard for Recombinant DNA-derived Erythropoietin: collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly purified human urinary erythropoietins. *J Endocrinol.*, **134**, 459-484.
130. Storing,P.L., Tiplady,R.J., Gaines Das,R.E., Rafferty,B., & Mistry,Y.G. (1996) Lectin-binding assays for the isoforms of human erythropoietin: comparison of urinary and four recombinant erythropoietins. *J Endocrinol.*, **150**, 401-412.

131. Sytkowski,A.J. (2004) Erythropoietin and Sport. Erythropoietin. Blood, Brain and Beyond., Wiley-Vch Verlag GmbH & Co.KGaA, Darmstadt, 183-97.
132. Takeuchi,M., Inoue,N., Strickland,T.W., Kubota,M., Wada,M., Shimizu,R., Hoshi,S., Kozutsumi,H., Takasaki,S., & Kobata,A. (1989) Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **86**, 7819-7822.
133. Takeuchi,M. & Kobata,A. (1991) Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins. *Glycobiology*, **1**, 337-346.
134. Takeuchi,M., Takasaki,S., Miyazaki,H., Kato,T., Hoshi,S., Kochibe,N., & Kobata,A. (1988) Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. *J Biol.Chem.*, **263**, 3657-3663.
135. Takeuchi,M., Takasaki,S., Shimada,M., & Kobata,A. (1990) Role of sugar chains in the *in vitro* biological activity of human erythropoietin produced in recombinant chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.*, **265**, 12127-12130.
136. Tarumoto,T., Imagawa,S., Ohmine,K., Nagai,T., Higuchi,M., Imai,N., Suzuki,N., Yamamoto,M., & Ozawa,K. (2000) N(G)-monomethyl-L-arginine inhibits erythropoietin gene expression by stimulating GATA-2. *Blood*, **96**, 1716-1722.
137. Toledo,J.R., Sanchez,O., Montesino,S.R., Fernandez,G.Y., Rodriguez,M.P., & Cremata,J.A. (2005) Differential *in vitro* and *in vivo* glycosylation of human erythropoietin expressed in adenovirally transduced mouse mammary epithelial cells. *Biochim.Biophys.Acta*, **1726**, 48-56.
138. Varki,A., Cummings,R., Esko,J., Freeze,H., Hart,G., & Marth,J. Essentials of glycobiology. 1st ed. 1999. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
139. Veng-Pedersen,P., Chapel,S., Al Huniti,N.H., Schmidt,R.L., Sedars,E.M., Hohl,R.J., & Widness,J.A. (2004) Pharmacokinetic tracer kinetics analysis of changes in erythropoietin receptor population in phlebotomy-induced anemia and bone marrow ablation. *Biopharm.Drug Dispos.*, **25**, 149-156.
140. Wasley,L.C., Timony,G., Murtha,P., Stoudemire,J., Dorner,A.J., Caro,J., Krieger,M., & Kaufman,R.J. (1991e) The importance of N- and O-linked

oligosaccharides for the biosynthesis and in vitro and in vivo biologic activities of erythropoietin. *Blood*, **77**, 2624-2632.

141. Wasley,L.C., Timony,G., Murtha,P., Stoudemire,J., Dorner,A.J., Caro,J., Krieger,M., & Kaufman,R.J. (1991) The importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and in vitro and in vivo biologic activities of erythropoietin. *Blood*, **77**, 2624-2632.
142. Weiss,M.J. (2003) New insights into erythropoietin and epoetin alfa: mechanisms of action, target tissues, and clinical applications. *Oncologist*, **8 Suppl 3**, 18-29.
143. Wen,D., Boissel,J.P., Showers,M., Ruch,B.C., & Bunn,H.F. (1994) Erythropoietin structure-function relationships. Identification of functionally important domains. *J.Biol.Chem.*, **269**, 22839-22846.
144. White,W., Gurney,C., Goldwasser,E., & Jacobson L.O. (1960) Studies on erythropoietin. *Recent Prog.Horm.Res.*, **16**, 219-262.
145. Wide,L. & Bengtsson,C. (1990) Molecular charge heterogeneity of human serum erythropoietin. *Br.J Haematol.*, **76**, 121-127.
146. Winearls,C.G., Oliver,D.O., Pippard,M.J., Reid,C., Downing,M.R., & Cotes,P.M. (1986a) Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis. *Lancet*, **2**, 1175-1178.
147. Winearls,C.G., Oliver,D.O., Pippard,M.J., Reid,C., Downing,M.R., & Cotes,P.M. (1986b) Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis. *Lancet*, **2**, 1175-1178.
148. Woessner,S. & Florensa,L. (2000) Hematopoyesis:mielopoyesis y linfopoyesis. La citología óptica en el diagnóstico hematológico (ed. by Fernández de la Hoz), Acción Médica,S.A: y Fundación Española de Hematología y Hemoterapia, Madrid, 1-61.
149. Wojchowski,D.M., Orkin,S.H., & Sytkowski,A.J. (1987) Active human erythropoietin expressed in insect cells using a baculovirus vector: a role for N-linked oligosaccharide. *Biochim.Biophys.Acta*, **910**, 224-232.
150. World Anti-Doping Agency. WADA History. Revisado el: 11-1-2007. Disponible en: <http://www.wada-ama.org/en/dynamic.ch2?pageCategory.id=253>

151. World Health Organization (2005) International Nonproprietary names for pharmaceutical substances (INN). Recommended International Nonproprietary names:List 54. *World Health Organization Drug Information*, **19**, 243-270.
152. World Health Organization. International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review). Programme on international nonproprietary names (INN), Quality Assurance and safety medicines QSM and Medicines policy and standard (PSM) department. *World Health Organization: INN working document* ;2006;**05.179**:, 1-29.
153. Ye,X., Rivera,V.M., Zoltick,P., Cerasoli,F., Jr., Schnell,M.A., Gao,G., Hughes,J.V., Gilman,M., & Wilson,J.M. (1999) Regulated delivery of therapeutic proteins after in vivo somatic cell gene transfer. *Science*, **283**, 88-91.
154. Yokomizo,R., Matsuzaki,S., Uehara,S., Murakami,T., Yaegashi,N., & Okamura,K. (2002) Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol.Hum.Reprod.*, **8**, 441-446.
155. Yoshimura,A. & Arai,K. (1996) Physician Education: The Erythropoietin Receptor and Signal Transduction. *Oncologist.*, **1**, 337-339.
156. Yuen,C.T., Storrington,P.L., Tiplady,R.J., Izquierdo,M., Wait,R., Gee,C.K., Gerson,P., Lloyd,P., & Cremata,J.A. (2003) Relationships between the N-glycan structures and biological activities of recombinant human erythropoietins produced using different culture conditions and purification procedures. *Br.J Haematol.*, **121**, 511-526.

CAPÍTULO 11

ANEXOS

ANEXO 1. PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO PARA LA DETERMINACION DE ERITROPOYETINA RECOMBINANTE Y SUSTANCIAS ANALOGAS EN ORINA HUMANA MEDIANTE ISOELECTROENFOQUE, DOBLE TRANSFERENCIA Y DETECCION POR QUIMIOLUMINISCENCIA.



IMAS
Institut Municipal
d'Investigació Mèdica. IMIM

UNITAT DE FARMACOLOGIA

**DIAGRAMA
DE FLUJO**

c/ Doctor Aiguader, 80. E-08003 Barcelona. NIF: P-5890004-D. Tel. (+34) 93 221 10 09. Fax (+34) 93 221 32 37. E-mail: postmaster@imim.es

DETERMINACIÓN: DETERMINACION DE ERITROPOYETINA RECOMBINANTE Y SUSTANCIAS ANÁLOGAS EN ORINA HUMANA MEDIANTE ISOELECTROENFOQUE, DOBLE TRANSFERENCIA Y DETECCION POR QUIMIOLUMINISCENCIA

CÓDIGO DET.:

PNT:

LOTE:

58 ___
59 ___
60 ___
61 ___

Dispensar la solución hasta llenar los vidrios
Dejar polimerizar (1h)
Dejar toda la noche en cámara húmeda
Encender el baño refrigerante (8±2°C)

Test ESTABILIDAD
(día anterior al IEF)

62 ___
63 ___
64 ___
65 ___
66 ___

600µl de orina en un eppendorf
Centrif. 10min. a 4000±50rpm.
Transferir 0.5ml del sobrenadante a YM-30 LOTE: []
+ 20µl Pepstatin A LOTE: []
+ 5µl de Complete LOTE: []

67 ___

Centrif. 2340±60g 20min, 20±5°C

CONCENTRADO (V≈30µl)

68 ___
69 ___
70 ___

+ 200µl TAS 50mM pH 5 LOTE: [] , vórtex 10s aprox.
Invertir filtro y ultrasonicar 2-3min.
Centrif. 1000±20g 2min en la misma posición.

71 ___
72 ___
73 ___

Transferir el retentado a un eppendorf y completar a 0.5ml con TAS 50mM pH 5 LOTE: []
+ 20µl Pepstatin A LOTE: []
+ 5µl de Complete. LOTE: []

74 ___
72 ___
73 ___

Incubar 15±2min.a temperatura ambiente.
+12.5µl solución control rEPO (2.34 IU/ml) LOTE: []
+20µl solución control NESP (9.38 ng/ml) LOTE: []

74 ___

Incubar toda la noche a 37°C

..... a la mañana siguiente:

75 ___
76 ___
77 ___

Revisar el gel
Retirar el vidrio hidrofóbico y tomar el gel
Cortar los bordes con el removedor de geles

IEF
(Multiphor II)

GEL LISTO PARA IEF



IMAS
Institut Municipal
d'Investigació Mèdica. IMIM

UNITAT DE FARMACOLOGIA

DIAGRAMA
DE FLUJO

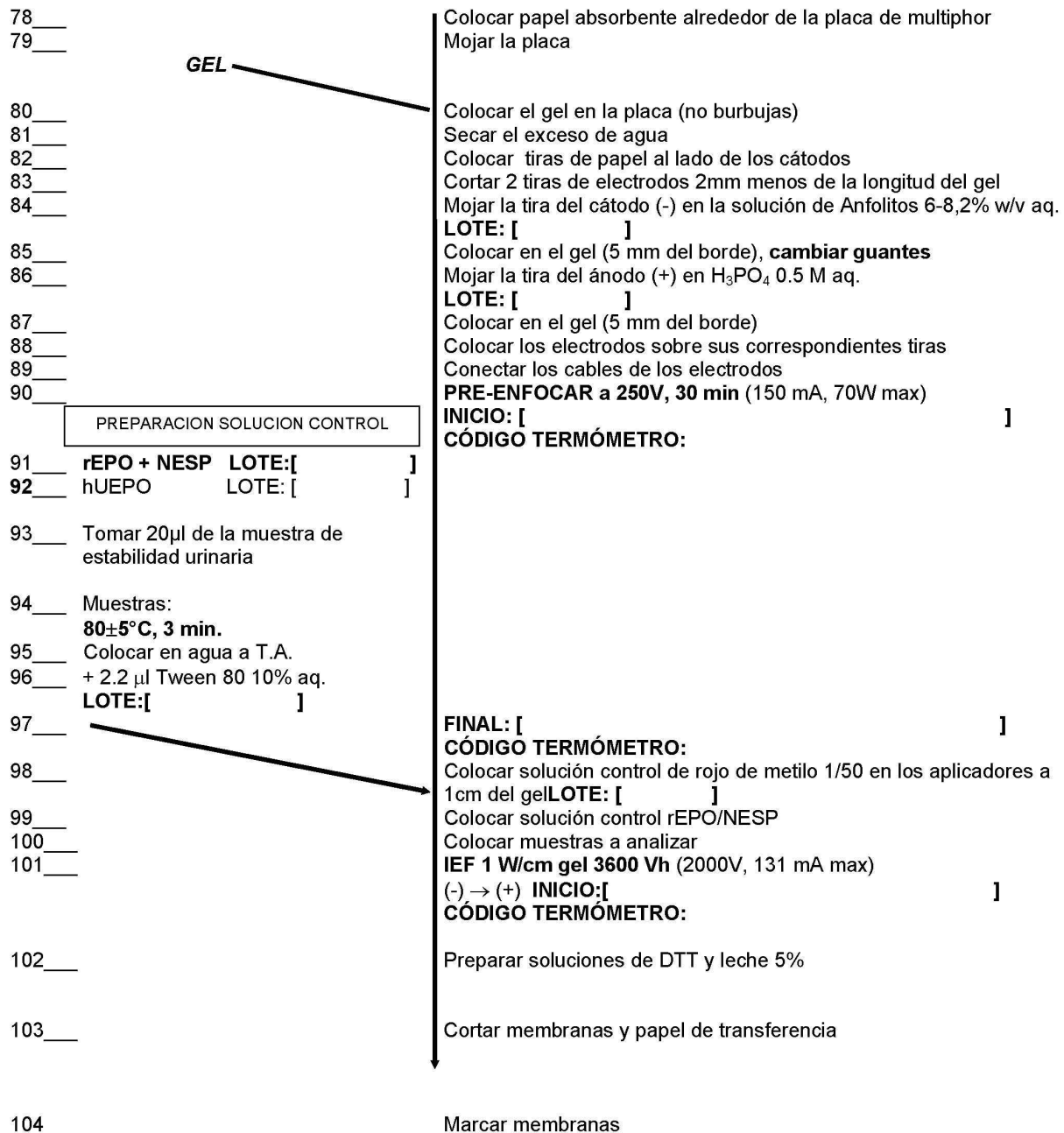
c/ Doctor Aiguader, 80. E-08003 Barcelona. NIF: P-5890004-D. Tel. (+34) 93 221 10 09. Fax (+34) 93 221 32 37. E-mail: postmaster@imim.es

DETERMINACIÓN: **DETERMINACION DE ERITROPOYETINA RECOMBINANTE Y SUSTANCIAS ANÁLOGAS EN ORINA HUMANA MEDIANTE ISOELECTROENFOQUE, DOBLE TRANSFERENCIA Y DETECCION POR QUIMIOLUMINISCENCIA**

CÓDIGO DET.:

PNT:

LOTE:





DETERMINACIÓN: **DETERMINACION DE ERITROPOYETINA RECOMBINANTE Y SUSTANCIAS ANÁLOGAS EN ORINA HUMANA MEDIANTE ISOELECTROENFOQUE, DOBLE TRANSFERENCIA Y DETECCION POR QUIMIOLUMINISCENCIA**

CÓDIGO DET.:

PNT:

LOTE:

105__
106__

FINAL IEF :[]
CÓDIGO TERMÓMETRO:

PRIMERA
TRANSFERENCIA

107__

Colocar en una bandeja

108__
109__
110__
111__

IMMOBILON P LOTE:[]
Lavar con metanol
Lavar con H₂O Milli-Q 2x

LOTE:[]
Colocar tampón de transferencia
LOTE:[]

112__

DURAPORE LOTE:[]

Colocar en el tampón de transferencia
(no deben haber burbujas)

113__

Papel de transferencia LOTE:[]

Colocar ambos grupos verticalmente (a
lado y lado de las paredes de la
bandeja)

114__
115__
116__

GEL ENFOCADO

Retirar de la placa fría el gel
Cortar las zonas donde se encuentra las muestras
Bandeja: tampón de transferencia

117__
118__
119__
120__
121__
122__

sumergir por 2min sin agitación
(gel con proteínas hacia abajo, no burbujas)
Colocar el ánodo de transferencia. (+)
Colocar grupo 9 papeles.
Colocar parafilm y pasar rodillo
retirar el gel
colocar el gel en el separador de geles
(gel con las proteínas hacia arriba)

123__
124__
125__

separar el gel del gelbond
+ DURAPORE
+ IMMOBILON P (Alineado con el durapore
No debe haber burbujas)

Transferencia I
(basica)

126__
127__
128__
129__

Colocar sándwich (debe quedar el gel hacia arriba)
Retirar el gelbond **suavemente**
Colocar grupo de 9 papeles.
Colocar parafilm y pasar rodillo

130__
131__

Eliminar exceso de gel y tampón de transferencia
Tapar con el cátodo de transf. (-)



IMAS
Institut Municipal
d'Investigació Mèdica. IMIM

UNITAT DE FARMACOLOGIA

**DIAGRAMA
DE FLUJO**

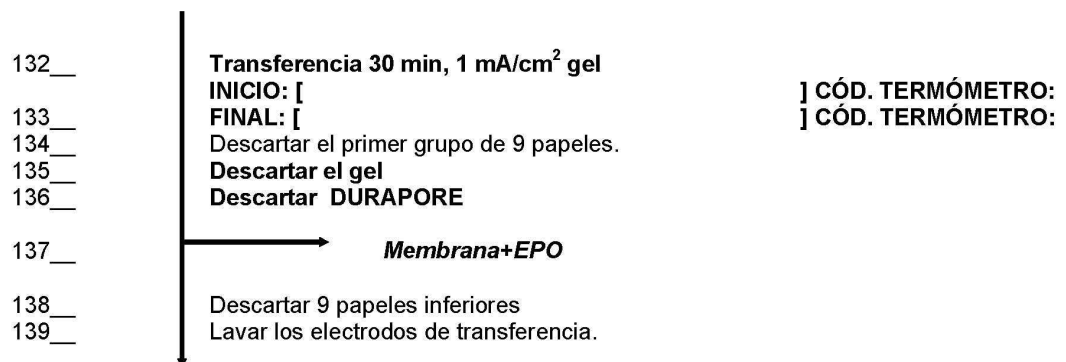
c/ Doctor Aiguader, 80. E-08003 Barcelona. NIF: P-5890004-D. Tel. (+34) 93 221 10 09. Fax (+34) 93 221 32 37. E-mail: postmaster@mim.es

DETERMINACIÓN: DETERMINACION DE ERITROPOYETINA RECOMBINANTE Y SUSTANCIAS ANÁLOGAS EN ORINA HUMANA MEDIANTE ISOELECTROENFOQUE, DOBLE TRANSFERENCIA Y DETECCIÓN POR QUIMIOLUMINISCENCIA

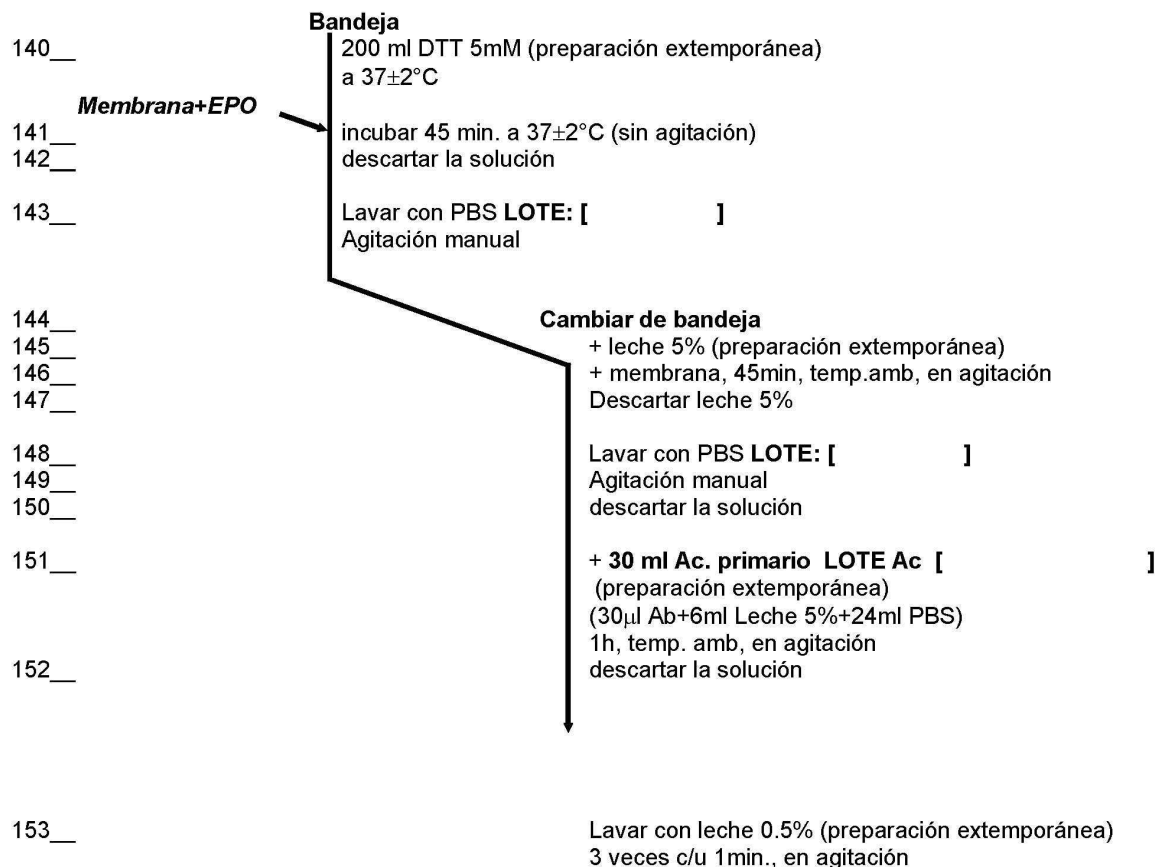
CÓDIGO DET.:

PNT:

LOTE:



1° ANTICUERPO





IMAS
 Institut Municipal
 d'Investigació Mèdica. IMIM

UNITAT DE FARMACOLOGIA

**DIAGRAMA
 DE FLUJO**

c/ Doctor Aiguader, 80. E-08003 Barcelona. NIF: P-5890004-D. Tel. (+34) 93 221 10 09. Fax (+34) 93 221 32 37. E-mail: postmaster@mim.es

DETERMINACIÓN: DETERMINACION DE ERITROPOYETINA RECOMBINANTE Y SUSTANCIAS ANÁLOGAS EN ORINA HUMANA MEDIANTE ISOELECTROENFOQUE, DOBLE TRANSFERENCIA Y DETECCION POR QUIMIOLUMINISCENCIA

CÓDIGO DET.:

PNT:

LOTE:

154__

Lavar con leche 0.5% (preparación extemporánea)
 3 veces c/u 10 min., en agitación

SEGUNDA
 TRANSFERENCIA

155__
 156__

IMMOBILON P LOTE:[]
 Lavar con metanol
 Lavar con H₂O Milli-Q 2x

LOTE:[]

157__

Colocar 0.7% HOAc
 LOTE:[]

158__

DURAPORE LOTE:[]

Colocar en 0.7% HOAc
 (no deben haber burbujas)

159__

Papel de transferencia LOTE:[]

Colocar ambos grupos verticalmente (a
 lado y lado de las paredes de la
 bandeja)

Transferencia II
 (ácida)

160__
 161__
 162__

Colocar el ánodo de transf. (+)
 Colocar grupo 9 papeles.
 Colocar parafilm y pasar rodillo

Membrana +EPO+Ab1

163__
 164__
 165__
 166__
 167__
 168__

Colocar membrana
(proteínas boca arriba)
 Colocar durapore
 Colocar **immobilon P**
 Colocar grupo 9 papeles.
 Colocar parafilm y pasar rodillo
Transferencia 10 min, 1 mA/cm² membrana

INICIO:[] CÓD. TERMÓMETRO:
 FINAL:[] CÓD. TERMÓMETRO:

169__
 170__
 171__
 172__
 173__
 174__

Descartar grupo de papeles superior
 Tomar membrana marcada INICIO 2, marcar líneas **Membrana +Ab1**
 Descartar durapore
 Guardar **Membrana 1+EPO**
 Descartar grupo de papeles inferior

QUIMIOLUMINISCENCIA

Membrana +Ab1



IMAS
Institut Municipal
d'Investigació Mèdica. IMIM

UNITAT DE FARMACOLOGIA

**DIAGRAMA
DE FLUJO**

c/ Doctor Aiguader, 80. E-08003 Barcelona. NIF: P-5890004-D. Tel. (+34) 93 221 10 09. Fax (+34) 93 221 32 37. E-mail: postmaster@imim.es

DETERMINACIÓN: DETERMINACION DE ERITROPOYETINA RECOMBINANTE Y SUSTANCIAS ANÁLOGAS EN ORINA HUMANA MEDIANTE ISOELECTROENFOQUE, DOBLE TRANSFERENCIA Y DETECCIÓN POR QUIMIOLUMINISCENCIA

CÓDIGO DET.:

PNT:

LOTE:

- 175 PBS LOTE: []
1 min, agitación.
- 176__ leche 5% (preparación extemporánea)
_____ min. _____ °C, agitación .
- 177__ PBS LOTE:[]
1 min, agitación
- 178__ + 40 ml Anticuerpo secundario LOTE Ac :[]
(preparación extemporánea)
(10µl Ab 2+8ml leche 5%+32ml PBS)
_____ min. _____ °C, agitación.
- 179__ leche 0.5% PBS (preparación extemporánea)
3 veces c/u 1 min, agitación,
- 180__ leche 0.5% PBS
3 veces c/u 10 min, agitación
- 181__ + 40 ml ESTREPTAVIDINA-PEROXIDASA (SP)
LOTE SP:[]
(20µl SP + 0.4g leche + 40 ml PBS) (preparación extemporánea)
1h agitación
- 182__ PBS LOTE:[]
3 veces c/u 1 min, agitación
- 183__ PBS LOTE:[]
3 veces c/u 10 min, agitación.
- 184__ + Reactivo de Quimioluminiscencia LOTE:[]
Realizar lectura

DISPENSADORES UTILIZADOS: Pipetas automáticas de volumen variable

VOLUMEN	0-10µl	10-20µl	20-50µl	50-200µl	200-1000µl	1000-5000µl
CODIGO						

MAPA DE DISTRIBUCIÓN DE MUESTRAS EN EL GEL



IMAS
Institut Municipal
d'Investigació Mèdica. IMIM

UNITAT DE FARMACOLOGIA

DIAGRAMA
DE FLUJO

c/ Doctor Aiguader, 80. E-08003 Barcelona. NIF: P-5890004-D. Tel. (+34) 93 221 10 09. Fax (+34) 93 221 32 37. E-mail: postmaster@imim.es

DETERMINACIÓN: **DETERMINACION DE ERITROPOYETINA RECOMBINANTE Y SUSTANCIAS ANÁLOGAS EN ORINA HUMANA MEDIANTE ISOELECTROENFOQUE, DOBLE TRANSFERENCIA Y DETECCION POR QUIMIOLUMINISCENCIA**

CÓDIGO DET.:

PNT:

LOTE:

POSICIÓN EN EL GEL	Muestras o soluciones control	V. Analizado V. Total	OBSERVACIONES
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			
18			
19			
20			
21			
22			
23			
24			

ANEXO 2. PROCEDIMIENTO DE EVALUACIÓN.

PROCEDURE FOR QUANTITATIVE IMAGE ANALYSIS

DRAWING THE ORIGIN LINE AND THE DENSITOMETER WINDOWS

1. **ORIGIN LINE:** Draw a line along the membrane, tangent to the more acidic band of every rEPO reference material samples (this line will fix the slope). Move this line (keeping the slope) just beyond the more basic visible band of the rEPO reference material samples. This corresponds to the origin line.
2. **DENSITOMETER WINDOWS:** Draw 0.5cm wide densitometer windows from the origin line so that they include all of the bands of any sample. Normally, these windows are perpendicular to the origin line and parallel to each other so that they can be drawn by duplication. In the case of disturbed migration, the window must be drawn to fit the migration.

PROCEDURE FOR QUANTITATIVE IMAGE ANALYSIS

3. Integrate all peaks of the first rEPO reference material “valley to valley”.
4. Mark the end of the last (most acidic) but one peak of the rEPO reference material.
5. Subtract the distance from the apex of the last peak to the previous valley. This value will be called “d” value.
6. Add this value to the position of the apex of the last peak and determine the abscissa of the corresponding point.
7. Repeat the steps 3 to 6 for every rEPO reference material and determine the different obtained abscissa.
8. Select the lowest abscissa. This corresponds to the separation point between basic and acidic bands.

CALCULATING THE VALUE OF THE % BASIC ISOFORMS

9. Calculate the sum of areas of all peaks below the “marker point” (basic isoforms) and divide it by the sum of areas of all peaks of the lane. Multiply by 100 to express the ratio obtained as a %.
10. Repeat this procedure for every sample.

ANEXO 3. POSTER: POTENTIAL ISOFORM DISCRIMINATION DURING IMMUNOAFFINITY PURIFICATION OF EPOETIN AND DARBEPOETIN.

POTENTIAL ISOFORM DISCRIMINATION DURING IMMUNOAFFINITY PURIFICATION OF EPOETIN AND DARBEPOETIN

V. Belalcázar¹, J. Segura^{1,2}, C. de Bolós¹, S.H Peng¹, R. Gutiérrez^{1,2}, E. Llop¹ and J. A. Pascual^{1,2}

1. Pharmacology Research Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona (Spain)

2. Dept. Experimental Sciences and Health, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona (Spain)



INTRODUCTION

Immunoaffinity chromatography (IAC) has been extensively used for the purification of human erythropoietin (hEPO) from biological samples. Product identification by SDS-PAGE reflects the average molecular weight but not the isoform distribution. However, microheterogeneity of the glycoprotein, particularly the sialic acid content has proven to be essential for its biological activity. Moreover, manufacturers of the recombinant protein (rhEPO) select and purified the more acidic isoforms for its commercial preparations. Isoform distribution is also essential in differentiating between endogenous urinary hEPO from rhEPO. This is the basis for the isoelectric focusing (IEF) method currently used in doping control.

The aim of the present work was to study the potential of different antibodies to discriminate between hEPO and rhEPO isoforms used in IAC and monitored by IEF.

EXPERIMENTAL

Immunoaffinity Columns:

- Monoclonal immunoaffinity column: 250µg of monoclonal anti-human EPO antibody (R&D Systems) immobilized on CNBr- activated Sepharose (Pharmacia)
- Polyclonal immunoaffinity column: 2mg of anti-human erythropoietin polyclonal antibody (Sigma) immobilized on CNBr- activated Sepharose (Pharmacia)

Samples preparation:

- Blank urines (OB) were spiked with the follow standard solution:
- 500 mIU of rEPO standard (alpha and beta isoforms, erythropoietin BRP Batch N°1; European Pharmacopoeia Commission)
 - 500-1000mIU of Human urinary EPO standard (endogenous isoforms, 2nd International reference preparation; WHO International Laboratory for Biological Standards) of human urinary EPO.
 - Darbepoetin: 10ng of NESP (novel erythropoiesis stimulating protein) Aranesp, Amgen.

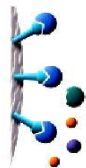
Samples analysis:

A. SAMPLE TREATMENT :

1. OB + standard solution (
2. Centrifugation
3. Filtration and concentration by Centricom® Plus- 20 (Millipore)

B. PURIFICATION BY MONOCLONAL AND POLICLONAL IAC :

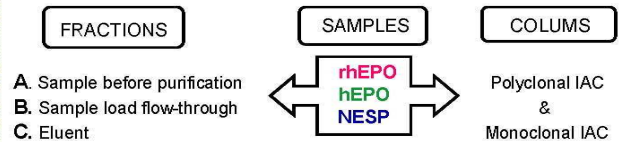
4. Equilibration: Tris 50mM, 1% BSA, pH 7.4, flow rate: 1ml/min
5. Sample loading: flow rate: 10 µL/min
6. Washing: Tris 50mM, 1% BSA, pH 7.4, flow rate: 1ml/min
7. Elution: Glycine- HCl 0.1 M, pH 2.2, flow rate: 1 ml/min
Eluents + Tris 1M, 1% BSA, pH 9 (neutralizing buffer).
8. Washing: Tris 50mM, 1% BSA, pH 7.4, flow rate: 1ml/min
9. Stored: 10 % Sodium azide



C. IEF, DOUBLE-BLOTTING AND DETECTION :

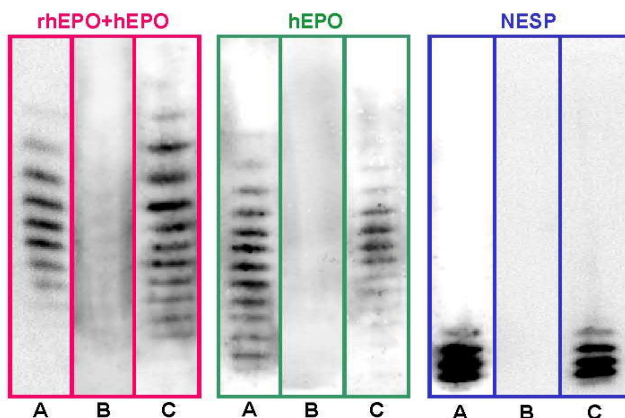
10. Polyacrylamide gel, 5% T, 3% C, 2-6 pH gradient, 7M Urea. 200V, 3600 Vh, 1W/ cm gel length.
11. Immunostaining with MAB anti-EPO (R&D Systems).
12. Double-blotting
13. Immunostaining with secondary antibody: biotinylated goat anti-mouse
14. Incubated with Streptavidin-peroxidase complex.
15. Detection by chemiluminescent used a Luminescent image analyser with a CCD camera (LAS-100, Fujifilm).

FRACTIONS ANALISED BY IEF:

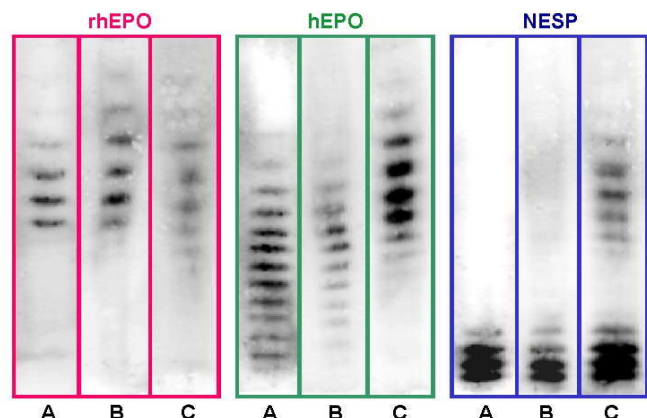


RESULTS

POLYCLONAL COLUMN



MONOCLONAL COLUMN



CONCLUSIONS

The monoclonal antibody retained preferently the more basic isoforms of hEPO and rhEPO. In the case of NESP all isoforms were recognised. The polyclonal antibody showed a marked affinity for hEPO and NESP and less for rhEPO. The capacity of the antibodies of purified some isoforms using IAC techniques acquires special relevance in the characterisation between different EPO related products.

REFERENCES

- Wojchowski, D.M. et al. *Biochim Biophys. Acta*, 1987, pg: 170-78.
 Lasne, F. *J Immunol. Methods*, 2001, pg: 125-131.
 Lasne, F. et al. *Anal. Biochem*, 2002, pg: 119-126.
 Pascual, J. A. et al. *Recent advances in doping analysis* (10), pg 135-144.
 Belalcázar, V. et al. *Recent advances in doping analysis* (11).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank all the staff from the Laboratory especially Belén Cano and David Díaz.

ANEXO 4. POSTER: STABILITY OF EPO IN URINE



V. Belalcázar^{1,2}, J. A. Pascual^{1,2}, S. Abanades¹, M. Farré^{1,3}, and R. Torre^{1,2}

1. Pharmacology Research Unit, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona (Spain). www.imim.es
 2. Dept. Experimental Sciences and Health, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona (Spain). www.upf.es
 3. Dept. of Pharmacology, Autonomous University of Barcelona (UAB)

INTRODUCTION

The issue of the stability of EPO (both natural and recombinant) in human urine has not been properly addressed in the literature. Different empirical protocols have been proposed in doping control in order to ensure the best transportation and storage conditions. The aim of the present study was evaluating the stability of erythropoietin in urine samples under different usual lab or transportation conditions.

MATERIAL AND METHODS

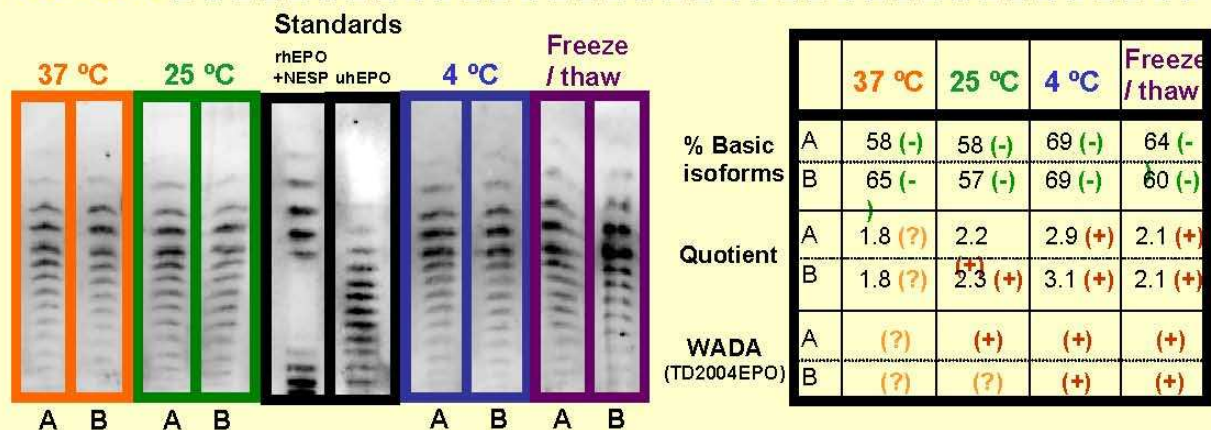
Urine samples obtained after administration of 3 consecutive doses of Epoetin beta (Neorecormon®, Roche) 20 IU/kg every 48h and pooled. NaN₃ (1%) was added as a preservative.

20 ml aliquots were submitted to the following storage conditions:

- after 3 freeze/thaw cycles
- 4 days at 4°C
- 4 days at room temperature (ca. 25°C)
- 4 days at 37°C

Samples were analysed according to the current urinary EPO method based on gel-IEF, double immunoblotting and chemiluminescence detection (Lasne et al, Anal. Biochem., 2002).

RESULTS



The concentration of EPO (attending at the response obtained by chemiluminescence), seemed to be fairly stable even at 37°C for 4 days. Maybe a very slow decline may be inferred from the data obtained.

The isoform profiles seemed to show a very slow change defined by the decline in the intensity of the basic isoforms.

CONCLUSIONS

For regular urine samples, i.e. in the absence of any residual "activity", the stability of urinary EPO is sufficient for normal transportation conditions, even at room temperature.

There is no indication of the alteration of the profile towards the creation of a false positive.

Optimal storage conditions seem to be 4°C avoiding both higher temperatures or freeze/thaw cycles.

BIBLIOGRAPHY

- Lasne, F. J Immunol Methods, 2001, (253), pg:125-131.
 Lasne, F. et al. Anal. Biochem, 2002, (311), pg:119-126.
 Pascual, J.A. et al. Recent advances in doping analysis, 2002, (10), pg:135-144.
 WADA Technical document TD2004EPO

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank B. Cano for the contribution to the present work.
 This work was funded by WADA.

