

Implementación de un ELISA de competencia para estudios de farmacocinética del péptido CIGB-300 en plasma humano

✉ Vilcy Reyes¹, Yasser Perera¹, Euyení Díaz¹, Ileana Rosales², Gerardo García², Silvio E Perea¹

¹ Laboratorio de Oncología Molecular, Subdirección de Investigaciones Biomédicas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa, CP 11600, La Habana, Cuba
² Departamento Control de la Calidad, CIGB ✉ vilcy.reyes@cigb.edu.cu

RESUMEN

El CIGB-300 es un péptido sintético que inhibe la fosforilación mediada por la enzima caseína quinasa 2 (CK2) y ejerce un marcado efecto antineoplásico en diferentes modelos preclínicos. En estudios fase I y II, se exploran sus efectos por varias vías de administración. En particular, la vía intravenosa requiere un método analítico confiable para su detección en plasma. Con este propósito, se desarrolló un ELISA de competencia, para detectar y cuantificar el péptido CIGB-300 en muestras de plasma humano. Este sistema mostró un límite de detección de 0.030 $\mu\text{g/mL}$ y un rango de trabajo de 10 a 0.039 $\mu\text{g/mL}$, que incluye las concentraciones alcanzadas en el plasma de pacientes tratados con CIGB-300. Además se determinó la variabilidad intraensayo ($\text{CV} < 5\%$) e interensayo ($\text{CV} < 17\%$) y el rango de recobrado del sistema (de 98.9 a 119.8 %). Finalmente, se evaluó el impacto de hasta tres ciclos de congelación-descongelación y de la conservación de la muestra a -80°C sobre la estabilidad del analito. Para todas las muestras del estudio de estabilidad se obtuvo un coeficiente de variación menor del 20 %. Los resultados fundamentan la aplicación de este método analítico como una nueva herramienta para los estudios farmacocinéticos de las primeras etapas de la investigación clínica con el nuevo fármaco anticáncer CIGB-300.

Palabras clave: CIGB-300, ELISA, validación, farmacocinética, vía intravenosa, fármaco anticáncer

Biotecnología Aplicada 2014;31:227-231

TÉCNICA

ABSTRACT

Implementation of a competitive ELISA for pharmacokinetics studies of CIGB-300 in human plasma. CIGB-300 is a synthetic peptide that inhibits the phosphorylation mediated by enzyme casein kinase 2 (CK2) and has a marked antineoplastic effect in different preclinical models. In the clinical setting, it's explored in phase I and II studies using different routes of administration. In particular, the use of the intravenous route requires a reliable analytical method for the detection of CIGB-300 in plasma. A competitive ELISA was developed to detect and quantify the CIGB-300 peptide in human plasma samples. This system showed a detection limit of 0.030 $\mu\text{g/mL}$ and a working range from 10 to 0.039 $\mu\text{g/mL}$, including concentrations achieved in plasma of patients treated with CIGB-300. In addition, the intra and inter-assay precisions were (coefficient of variation $< 5\%$) and ($\text{CV} < 17\%$) and the recovered range from 98.9 to 119.8 %. Finally, the impact of three freeze-thaw cycles and the sample storage at -80°C on the stability of the analyte was evaluated. We obtained a $\text{CV} < 20\%$ for all samples in the stability study. The results support the application of this analytical method as a new tool for the pharmacokinetic studies of the early stages of clinical research with the new anti cancer drug CIGB-300.

Keywords: CIGB-300, ELISA, system validation, pharmacokinetics, intravenous route, anticancer drug

Introducción

El CIGB-300 es un péptido sintético que inhibe la fosforilación mediada por la enzima caseína quinasa 2 (CK2), y ejerce un marcado efecto antineoplásico en diferentes modelos preclínicos *in vitro* e *in vivo* [1]. Varias evidencias experimentales en líneas celulares derivadas de cánceres de pulmón, cervix, próstata y colon sugieren que la proteína multifuncional B23/NPM, sustrato validado de la CK2, es un blanco molecular relevante para el CIGB-300 en células tumorales [2]. Como resultado de una extensa experimentación farmacológica *in vivo*, se recopilieron datos de eficacia antitumoral y seguridad, que conformaron el soporte preclínico para la exploración del péptido CIGB-300 en estudios clínicos [3].

El péptido CIGB-300 se evaluó por primera vez en seres humanos en el año 2006. Este estudio clínico pionero consistió en su aplicación directa en lesiones

pre malignas de cervix, y aportó las primeras evidencias robustas de seguridad del producto [4]. No obstante, dos de los nichos oncológicos en los que actualmente se explora son las neoplasias malignas de pulmón y la leucemia mieloide aguda (LMA), localizaciones tumorales que deben ser tratadas utilizando una vía sistémica de administración del fármaco, por ser difíciles de intervenir (como el cáncer de pulmón) o constituir una enfermedad diseminada (como la LMA). En este contexto, la implementación de un sistema analítico que permita estimar las concentraciones del compuesto en los fluidos biológicos de los pacientes y calcular los parámetros farmacocinéticos, es una herramienta imprescindible para la optimización y futuro desarrollo del fármaco en la investigación clínica [5].

Los estudios farmacocinéticos con el CIGB-300 en modelos animales y humanos, se basan en la estimación

1. Perea SE, Reyes O, Puchades Y, Mendoza O, Vispo NS, Torrens I, et al. Antitumor effect of a novel proapoptotic peptide that impairs the phosphorylation by the protein kinase 2 (casein kinase 2). *Cancer Res.* 2004;64(19):7127-9.
2. Perera Y, Costales HC, Díaz Y, Reyes O, Farina HG, Mendez L, et al. Sensitivity of tumor cells towards CIGB-300 anticancer peptide relies on its nucleolar localization. *J Pept Sci.* 2012;18(4):215-23.
3. Perera Y, Farina HG, Hernandez I, Mendoza O, Serrano JM, Reyes O, et al. Systemic administration of a peptide that impairs the protein kinase (CK2) phosphorylation reduces solid tumor growth in mice. *Int J Cancer.* 2008;122(1):57-62.

de las concentraciones del péptido en el plasma mediante un método radiactivo con una variante de CIGB-300 conjugada a tecnecio ^{99}Tc [3, 6]. Sin embargo, los métodos radiactivos presentan importantes limitaciones, pues impide conocer cuánto de la señal radiactiva registrada se corresponde con el péptido íntegro y no con degradaciones de este. Ello pudiera conducir a sobrestimaciones de la cantidad real de molécula circulante y, por ende, a una incorrecta evaluación de sus parámetros farmacocinéticos [7].

El sistema ELISA es una de las metodologías más empleadas en laboratorios clínicos y analíticos para estudios farmacocinéticos [8]. Es muy sensible para la cuantificación de analitos en muestras complejas y no presenta peligros para la salud humana [9]. Nuestro grupo implementó un ensayo de competencia tipo ELISA que utiliza un anticuerpo policlonal generado contra el CIGB-300, para la captura de ese analito presente en el plasma. Para su establecimiento, inicialmente se determinaron los parámetros: exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad, recomendados para este tipo de análisis [10].

Materiales y métodos

Reactivos

El reactivo Tween 20 se adquirió a Sigma Aldrich Labochemikalien GmbH, Reino Unido. Se emplearon los anticuerpos policlonal anti-CIGB-300 desarrollado en conejo (Atlanbio, Francia) y anti-conejo peroxidasa (Sigma, Missouri, EE.UU.). Las soluciones de sustrato y de parada para la reacción inmunoenzimática se adquirieron de R & D Systems (Minneapolis, EE.UU.), y la solución bloqueadora Seablock a EastCoastBio (Maine, EE.UU.). Las soluciones de lavado (Tween 20 al 0.05 %), y de dilución (Tween 20 al 0.1 % y suero fetal bovino (SFB; PAA, Canadá) al 2 %), se prepararon en tampón fosfato salino (PBS; NaCl 1.37 M, KCl 27 mM, Na_2HPO_4 100 mM, KH_2PO_4 18 mM, pH 7.4) al 1×.

Como material de referencia del analito se empleó el lote del péptido CIGB-300 P-300-02-0807 (CIGB, La Habana, Cuba).

Muestras de plasma humano

Las muestras de plasma de los donantes sanos las suministró el Banco de Sangre del Vedado, La Habana, Cuba. Las de los pacientes con cáncer (carcinoma de vulva con metástasis en pulmón, adenocarcinoma de células no pequeñas de pulmón, cáncer retroperitoneal, adenocarcinoma de recto con infiltración de músculo) las suministró el Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas (Cimeq). Las muestras se almacenaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su descongelación (solamente una vez).

Ensayo inmunoenzimático

Se recubrió una placa ELISA/RIA (placas de poliestireno *high binding* EIA, Costar, EE.UU.) con 100 μL del CIGB-300 (material de referencia) disuelto a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en solución salina tampón fosfato (PBS) 1×. Se incubó a $4\text{ }^\circ\text{C}$ durante 16 h. Seguidamente se bloqueó con 200 μL de solución de bloqueo Seablock a temperatura ambiente (TA; $25\text{ }^\circ\text{C}$) en la oscuridad,

durante 2 h. A continuación se adicionaron 50 μL de las diluciones seriadas del CIGB-300 (curva estándar) en un rango de concentraciones de 0 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o de la muestra problema conjuntamente con 50 μL del suero policlonal de conejo anti-CIGB-300 previamente diluido 1:10 000 en PBS 1×. La placa se incubó a TA en la oscuridad durante 2 h. Posteriormente se realizaron cuatro lavados con solución PBS 1×-Tween 20 al 0.05 % y se adicionaron 100 μL del conjugado anti-conejo peroxidasa diluido en tampón de dilución, y se incubó a TA en la oscuridad durante 2 h. Después se efectuaron cuatro lavados con solución PBS 1×-Tween 20 al 0.05 % y se adicionaron 100 μL por pocillo de la solución sustrato, y se incubaron durante 30 min a TA en la oscuridad. Para detener la reacción, se adicionaron 100 μL de la solución de parada y se realizó la lectura de la absorbancia a 450 nm ($\text{Abs}_{450\text{nm}}$) en un lector de placas SUMA modelo PR-521 (Centro de Inmunoensayo, Cuba).

Finalmente, para los cálculos se sustrajo a todos los valores de $\text{Abs}_{450\text{nm}}$ del ensayo el valor de la $\text{Abs}_{450\text{nm}}$ base (muestra sin recubrimiento con CIGB-300). La curva de calibración se graficó con el cociente de unión/unión máxima ($B/B_{\text{máx}}$) en las ordenadas contra logaritmo de la concentración de CIGB-300 en las abscisas, y la ecuación resultante se ajustó mediante un modelo no-lineal sigmoidal de pendiente variable (programa Prisma, versión 4.0). El valor de concentración del CIGB-300 se obtuvo mediante la extrapolación del valor individual de $B/B_{\text{máx}}$ de cada muestra problema en la curva de calibración. La $B_{\text{máx}}$ se define como el valor equivalente a una concentración cero del CIGB-300 en el plasma evaluado; por tanto, la mayor $\text{Abs}_{450\text{nm}}$ detectada.

Parámetros de calidad del ensayo

La repetibilidad se comprobó mediante cuatro curvas de la misma muestra en idénticas condiciones, en un mismo ensayo, el mismo día. Para la precisión intermedia se realizaron cuatro curvas de la misma muestra en idénticas condiciones, en diferentes ensayos, en diferentes días.

Para determinar la linealidad del sistema y el rango de trabajo (RT), se realizaron cuatro curvas de calibración durante la validación (en días diferentes). Las concentraciones del analito en los puntos de la curva fueron 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 0.039 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El límite de detección inferior (LDI) se determinó mediante la sustracción al valor de $\text{Abs}_{450\text{nm}}$ correspondiente a $B_{\text{máx}}$ de dos desviaciones estándar (DE) en la curva de calibración del sistema ($\text{LDI} = B_{\text{máx}} - 2\text{DE}$). El límite de detección superior (LDS) se calculó interpolando el valor de ABS correspondiente al fondo del sistema ($\text{LDS} = \text{media} + 2\text{DE}$). El RT se definió como el rango de concentraciones comprendido entre los límites superior e inferior del sistema ($\text{LDI} \leq \text{RT} \leq \text{LDS}$).

La especificidad se determinó como la capacidad del método ELISA para detectar el analito de forma específica, en presencia de componentes que pueden estar en la matriz e interferir con el sistema. Para este propósito, se procesó el plasma de cuatro individuos y se analizaron concentraciones conocidas del analito (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.039 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se compararon los valores de $\text{Abs}_{450\text{nm}}$

4. Solares AM, Santana A, Baladron I, Valenzuela C, Gonzalez CA, Diaz A, et al. Safety and preliminary efficacy data of a novel casein kinase 2 (CK2) peptide inhibitor administered intralesionally at four dose levels in patients with cervical malignancies. *BMC Cancer*. 2009;9:146.

5. European Medicines Agency. Guideline on the clinical investigation of the pharmacokinetics of therapeutic proteins Committee for medicinal products for human use (CHMP). London: EMEA; 2007 [cited 2013 Nov 17]. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003029.pdf.

6. Soriano-García JL, López-Díaz A, Solares-Asteasuainzarra M, Baladrón-Castrillo I, Batista-Albuérne N, García-García I, et al. Pharmacological and safety evaluation of CIGB-300, a casein kinase 2 inhibitor peptide, administered intralesionally to patients with cervical cancer stage IB2/II. *J Cancer Res Ther*. 2013;1(6):163-73.

7. Richter M, Cyranka U, Nowak G, Walsmann P. Pharmacokinetics of 125I-hirudin in rats and dogs. *Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch*. 1988;115(1-2):64-9.

8. Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem*. 2005;51(12):2415-8.

9. Wild D, editor. *The immunoassay Hand-book*. 2nd ed. London: Nature Publishing Group; 2001.

10. Bansal S, DeStefano A. Key elements of bioanalytical method validation for small molecules. *AAPS J*. 2007;9(1):E109-14.

correspondientes de cada una de estas muestras con los valores de Abs_{450nm} para esa misma concentración de analito en la curva estándar.

Para la medición de la especificidad, si la estimación de la concentración del analito es exacta, no existen interferencias en el sistema matriz factor (FM), con valor 1. El FM se calculó según el cociente de respuesta en presencia del analito de la matriz sobre la respuesta en su ausencia. El coeficiente de variación porcentual (CV %) entre ellas debe ser menor o igual a 20 %, por lo que el FM debe ser mayor o igual a 0.8, y menor o igual a 1.2, para cada uno de los plasmas analizados con respecto a la mezcla, cuya determinación se realizó en el plasma de donantes sanos (plasma estándar).

El recobrado del sistema (REC) se determinó usando tres concentraciones del analito en el plasma de pacientes ($n = 4$) y en el plasma estándar. Se calculó como el cociente entre las ABS de diferentes concentraciones del analito (X) en la matriz que se debía evaluar y la ABS de concentraciones equivalentes del analito en el plasma estándar, según la siguiente fórmula:

$$REC = \frac{Abs_{450nm} (X \text{ plasma paciente})}{Abs_{450nm} (X \text{ plasma estándar})} \times 100$$

Para el análisis de la estabilidad del analito en el plasma se realizaron análisis de varianza en la muestra almacenada a -80°C , en las muestras sujetas a ciclos sucesivos (hasta 3 ciclos) de congelación-descongelación (-80°C -TA), y del analito en la matriz sin procesar.

Estabilidad de la muestra almacenada a -80°C

Las muestras del analito en plasma se prepararon a tres concentraciones: alta ($10 \mu\text{g/mL}$), media ($0.6 \mu\text{g/mL}$) y baja ($0.039 \mu\text{g/mL}$). De las muestras preparadas, se analizaron dos réplicas de cada nivel de concentración al tiempo 0. Las demás muestras se almacenaron a -80°C y se analizaron a los 18 y 30 días. La concentración de la determinación inicial se comparó con el valor de concentración de las muestras almacenadas a mediano y largo plazo.

Estabilidad de la muestra en ciclos de congelación-descongelación

Las muestras preparadas a las tres concentraciones se sometieron a uno, dos o tres ciclo de congelación-descongelación (-80°C -TA). Después de cada ciclo, la muestra se procesó y analizó según lo descrito. Las determinaciones se compararon con el análisis de muestras no sometidas a este tratamiento y el experimento se hizo por duplicado para cada nivel de concentración, en cada grupo experimental.

Los resultados de las determinaciones se procesaron en el programa Prisma (versión 4.0).

Análisis estadístico

Se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación porcentual, mediante el programa Excel 2007 de Microsoft® (Microsoft Corp.; EE.UU.).

Resultados y discusión

El péptido CIGB-300 es un nuevo fármaco antitumoral con un potente efecto antineoplásico en modelos

preclínicos de cáncer [1], y cuya fase de evaluación clínica transcurre actualmente. Esta molécula inhibe la fosforilación mediada por CK2, un blanco molecular oncológicamente validado [11]. En el año 2006 se evaluó por primera vez en seres humanos, a los que se administró directamente en lesiones premalignas de cérvix, y demostró ser seguro y bien tolerado [4]. Los nuevos nichos oncológicos en los que se explora esta molécula son las neoplasias malignas de pulmón y la leucemia mieloide aguda (LMA), cuya ruta de administración debe ser la sistémica. La implementación de un sistema analítico que permita estimar las concentraciones y calcular parámetros farmacocinéticos en fluidos biológicos, es un objetivo primordial para la optimización y el desarrollo de este fármaco [5].

En los primeros estudios de biodisponibilidad del CIGB-300 en los fluidos biológicos se empleó un método radiactivo, en el que se conjugó el péptido a tecnecio 99 (Tc^{99}) [3, 6]. Si bien se pudieron estimar las concentraciones de CIGB-300 que se alcanzan en el plasma humano, así como las correlaciones preliminares con variables de biodistribución, toxicidad y signos de eficacia clínica, las desventajas de este método son ampliamente conocidas [12, 13].

Como alternativa, se han desarrollado ensayos inmunoenzimáticos que incluyen la especificidad, sensibilidad, reproducibilidad y rapidez, entre otras ventajas [14, 15], y permiten cuantificar péptidos y proteínas en matrices biológicas de manera rutinaria. Este trabajo describe el proceso de desarrollo e implementación de un sistema ELISA de competencia para la determinación del péptido CIGB-300 en el plasma humano. Es el primer método que permite monitorear la presencia de la molécula íntegra en fluidos biológicos, de manera relativamente fácil y confiable, y evita los riesgos que implica el trabajo con isótopos radiactivos [16].

El sistema ELISA implementado permitió detectar el analito en el plasma humano en el rango nanomolar, con un LDI estimado de $0.030 \mu\text{g/mL}$. La determinación de los límites de detección es un paso importante para todo sistema analítico, pues define la cantidad mínima de analito que puede ser cuantificada de manera confiable en un fluido biológico, y al mismo tiempo determinar el límite inferior del RT del sistema [17]. Un límite de detección bajo posibilita el seguimiento del péptido en el plasma durante mayor tiempo. Un número superior de puntos experimentales contribuye a una mejor estimación de los parámetros farmacocinéticos del fármaco en estudio. Por otra parte, la estimación del LDS a partir de las curvas de dosis-respuesta obtenidas, indicó que el ELISA puede detectar concentraciones del CIGB-300 en el plasma humano de hasta $15 \mu\text{g/mL}$, sin necesidad de una dilución previa. Estas determinaciones permitieron establecer un RT amplio y confiable (de 0.039 a $10.0 \mu\text{g/mL}$) para futuras evaluaciones, con el fin de estimar las concentraciones del analito en muestras de plasma de pacientes con cáncer.

Otros parámetros importantes en el establecimiento de un método analítico son la precisión y la exactitud, características del rendimiento que describen la magnitud de los errores aleatorios y sistemáticos [18]. Durante el estudio de la variabilidad intraensayo se obtuvo un CV menor de un 5 % para cada punto

11. Seeber S, Issinger OG, Holm T, Kristensen LP, Guerra B. Validation of protein kinase CK2 as oncological target. *Apoptosis*. 2005;10(4):875-85.

12. Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest*. 1960;39:1157-75.

13. Ekins RP. The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. *Clin Chim Acta*. 1960;5:453-9.

14. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*. 1971;8(9):871-4.

15. Van Weemen BK, Schuur AH. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett*. 1971;15(3):232-6.

16. Zakowicz, H. A 40-Year-Old Paradox: The Fascinating History of the ELISA. *Boster Immunoleader*; 2013.

17. DeSilva B, Smith W, Weiner R, Kelley M, Smolec J, Lee B, et al. Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. *Pharm Res*. 2003;20(11):1885-900.

18. U.S. Department of Health and Human Services. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Rockville: US Department of Health and Human Services; 2001 [cited 2013 Nov 17]. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm071017.pdf>

de la curva (Tabla 1), mientras que los valores para la precisión intermedia estuvieron entre 14 y 17 % (Tabla 2). Esto significa que el ensayo es reproducible y ofrece una precisión aceptable, según lo establecido para este tipo de determinación donde el CV debe ser menor del 20 % [19].

Para el análisis de la linealidad, se empleó un ensayo de unión a ligando, que emplea el modelo logístico de cuatro parámetros (4 PL). Este tipo de ensayo se comporta típicamente con una relación sigmoïdal no lineal, entre la concentración del analito y la respuesta. Se escogió este modelo porque optimiza la precisión y exactitud en el rango de calibración que se esté empleando (de 5 a 8 concentraciones que se han de evaluar) [20, 21]. Las curvas de calibración presentan un coeficiente de determinación mayor o igual a 0.98 ($R^2 \geq 0.98$) (Figura 1). Mientras más cercano a 1 sea el R^2 , habrá un mejor ajuste de los datos al modelo empleado y ello, además, es otro elemento en favor de la precisión y exactitud del ensayo.

Con el fin de establecer la selectividad del sistema, se evaluó la influencia de la matriz biológica empleada en las determinaciones. Los valores de FM, obtenidos en las muestras de plasma de los pacientes con cáncer, en cada punto de la curva, se encuentran entre 0.8 y 1.0 (Tabla 3). Aunque este resultado debe ser corroborado en un mayor número de muestras, se demostró que las interferencias que pudieran existir en el plasma, como proteínas, lípidos o la hemólisis de alguna de las muestras, no afectan significativamente la determinación del CIGB-300. Otra medida de la capacidad del sistema de detectar el analito es mediante el estudio del recobrado. Este se expresa como la relación porcentual entre la respuesta obtenida para el analito en una muestra (por ejemplo, plasma de un paciente) con relación a la respuesta obtenida para la misma cantidad de analito en una matriz estándar (por ejemplo, plasma de un individuo sano) [18]. Se analizaron tres concentraciones: alta (10 $\mu\text{g/mL}$),

Tabla 1. Análisis de la repetibilidad de un ELISA de competencia para estudios de farmacocinética del péptido CIGB-300 en plasma humano*

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Medias	Coficiente de variación (%)
10	0.224	5
2.5	0.427	3
0.6	0.558	5
0.15	0.603	2
0.039	0.748	3

* Se muestran los resultados de la variabilidad del sistema procesado en el mismo día, bajo las mismas condiciones (n = 4).

Tabla 2. Análisis de la precisión intermedia de un ELISA de competencia para estudios de farmacocinética del péptido CIGB-300 en plasma humano*

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Medias	Coficiente de variación (%)
10	0.305	14
2.5	0.560	16
0.6	0.723	15
0.15	0.800	15
0.039	0.959	17

*Se muestran los resultados del análisis de la variabilidad interensayo (n = 10).

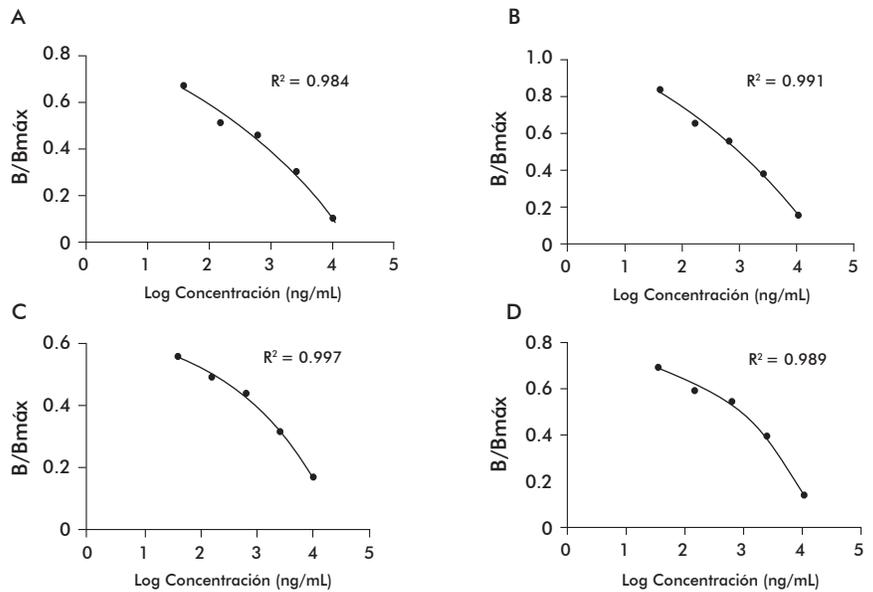


Figura 1. Análisis de la linealidad de un ELISA de competencia para estudios de farmacocinética del péptido CIGB-300 en plasma humano. Curvas generadas en cuatro días diferentes (A-D), elaboradas con el programa Prism (versión 4.0). Los cuatro ensayos fueron hechos por el mismo analista.

media (0.6 $\mu\text{g/mL}$) y baja (0.039 $\mu\text{g/mL}$), y se obtuvieron 110.2, 98.9 y 119.8 %, respectivamente. Las interferencias presentes en la muestra influyen positivamente en el recobrado. Para los valores extremos de la curva, el análisis del recobrado indica que se pueden sobrestimar las concentraciones del CIGB-300. Sin embargo, estos resultados se deben interpretar con cautela, pues el aumento de los valores del recobrado se ubica dentro de la variabilidad del sistema.

Finalmente se estudió la estabilidad de la muestra en dos y tres ciclos de congelación-descongelación (-80 $^{\circ}\text{C}$ -TA). Los experimentos de estabilidad deben simular las condiciones en que se recogerán, procesarán y almacenarán las muestras de estudio. La estabilidad de la muestra se puede evaluar durante la fase de implementación del método, para lo cual generalmente se incluyen estudios a temperatura ambiente, de 2 a 8 $^{\circ}\text{C}$, y ciclo de congelación-descongelación. Estas evaluaciones permiten definir cuándo las muestras serán desechadas del ciclo de vida del sistema [17]. Varios análisis físico-químicos evidenciaron que la molécula CIGB-300, no es estable a 4 $^{\circ}\text{C}$. Por esta razón y considerando el elevado número de proteasas en la sangre [22], nuestros estudios de estabilidad

19. Kelley M, DeSilva B. Key elements of bioanalytical method validation for macromolecules. The AAPS J. 2007;9(2):E156-63.

20. Findlay JW, Dillard RF. Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays. The AAPS journal. 2007;9(2):E260-7.

21. Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan. Draft Guideline on Bioanalytical Method (Ligand Binding Assay) Validation in Pharmaceutical Development. Tokyo: MHLW; 2014 [cited 2014 Jan 27]. Available from: http://www.nihs.go.jp/drug/BMV/BMV-LBA_draft_140124_E_rev.pdf

Tabla 3. Evaluación de la interferencia por la matriz en un ensayo ELISA de competencia para estudios de farmacocinética del péptido CIGB-300 en plasma humano*

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Matrices				Medias	Coficiente de variación (%)
	1	2	3	4		
10	0.853	0.742	0.872	0.966	0.858	11
2.5	0.836	0.869	0.851	0.815	0.843	2
0.6	0.740	0.804	0.776	0.786	0.777	4
0.15	0.748	0.883	0.938	0.900	0.867	10
0.039	0.912	0.994	0.989	1.023	0.979	6

* La interferencia se expresa como el cociente de la relación B/Bmáx del punto en cada matriz y la relación B/Bmáx del punto en el plasma estándar.

se realizaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. En los intervalos de tiempo analizados con respecto al momento inicial (t_0), el CV se mantuvo en el rango de 3 a 6 % (Figura 2A), lo que indica que una misma alícuota de la muestra puede ser reevaluada al menos tres veces sin comprometer la estimación del analito. En relación con la estabilidad a largo plazo, en el estudio de la muestra almacenada 18 días, el CV con respecto a t_0 , se mantuvo en el rango de 3 a 14 % (Figura 2B). Para la muestra almacenada durante 30 días, el CV en los tiempos analizados con respecto a t_0 se mantuvo en el rango de 6 a 19 % (Figura 2B). De conjunto, estos resultados permiten establecer que el analito es estable en plasma humano durante los tiempos evaluados en estas condiciones de almacenamiento. Este hallazgo es importante desde el punto de vista operativo en el laboratorio pues brinda cierta flexibilidad para la evaluación de la muestra.

La cuantificación de analitos mediante la plataforma tipo ELISA generalmente es sencilla, cuando se trata de un anticuerpo de alta especificidad, como en el caso del anticuerpo empleado en este estudio [5]. Se han descrito varios ensayos inmunoenzimáticos para la detección de fármacos de origen peptídico. Uno de ellos es un ELISA de competencia, disponible de forma comercial, desarrollado para la detección y cuantificación del exenatide, versión sintética del exendin-4. El exenatide es un agonista del péptido similar al glucagón tipo 1 (agonista GLP-1), empleado en el control de la glicemia, aprobado desde 2005 [23] para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo II [24]. Este sistema detecta hasta $0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$ con un LDI de $0.00008\text{ }\mu\text{g/mL}$ [25]. Otro ELISA de competencia fue diseñado para detectar la presencia del péptido hepcidin, el cual contribuye a la patogénesis de la anemia crónica. El sistema mostró un LDI de $5.5\text{ }\mu\text{g/mL}$, y una variación intraensayo de entre 8 y 15 %, e interensayo de entre 5 y 16 %, con un recobrado de un 107 % [26]. De manera interesante, la estimación del LDI de nuestro sistema evidenció que el ensayo es superior en este parámetro a uno de los ELISA descritos (hepcidin), mientras que la variación intra e interensayo se comportó de manera similar ($\text{CV} < 20\%$). Adicionalmente, como medida de la selectividad se compararon los recobrados, cuyos valores se comportaron dentro del 20 % de variación.

A pesar de que un proceso de validación para el ensayo de unión a ligando requiere la introducción

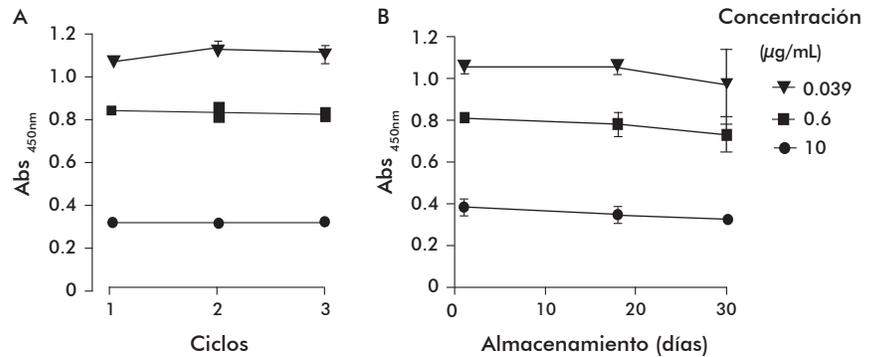


Figura 2. Estabilidad de la muestra de plasma de individuos sanos, expuestas a diferentes tratamientos durante el establecimiento de un ensayo ELISA para estudios de farmacocinética del péptido CIGB-300 en plasma humano. A) Ciclos de congelación-descongelación ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -TA). B) Almacenamiento a largo plazo a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las barras de error representan la desviación estándar.

de otras variables (por ejemplo, equipos, analistas, número de réplicas, muestras biológicas, entre otras) y métodos de análisis de datos [17], el sistema implementado es preciso y exacto. El ensayo permite la cuantificación del péptido CIGB-300 en el plasma humano, de manera confiable y reproducible, sin los posibles errores de estimación derivados de la degradación del péptido, que son frecuentes en los métodos radiactivos. Al mismo tiempo, esta etapa de implementación permitió establecer los reactivos críticos, el tipo de revelado del sistema y el diseño experimental (es decir, número de placas, colocación de los patrones/muestras de validación, número de repeticiones, condiciones de operación y el tamaño de los lotes de evaluación), elementos que necesitan ser confirmados durante la futura etapa de validación [17].

Considerando las ventajas de un sistema analítico tipo ELISA descritas, el nuevo método se erige como una alternativa robusta, flexible y fácil de implementar, con el objetivo de estudiar la farmacocinética del péptido CIGB-300 en los futuros ensayos clínicos.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Marta Ayala, la Ing. Indira Pla, la MSc. Cristina Rodríguez, al Ing. Osvaldo Ávila Echemendía y a la Comisión de Validación, todos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, de La Habana, Cuba, por sus contribuciones en este trabajo.

22. Matsui T, Imamura M, Oka H, Osajima K, Kimoto K, Kawasaki T, et al. Tissue distribution of antihypertensive dipeptide, Val-Tyr, after its single oral administration to spontaneously hypertensive rats. *J Pept Sci.* 2004;10(9):535-45.

23. Lax R, Meenan, Ch. Challenges for Therapeutic Peptides Part 1: On the Inside, Looking Out. *Innovations in Pharmaceutical Technology.* 2012(42):54-6.

24. Fineman M, Flanagan S, Taylor K, Aisporna M, Shen LZ, Mace KF, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of exenatide extended-release after single and multiple dosing. *Clin Pharmacokinet.* 2011;50(1):65-74.

25. Creative Diagnostics. Heloderma Suspectum Exendin-4 ELISA Kit Cat. No. DEIA10583. New York: Creative Diagnostics; 2013 [cited 2013 Nov 17]. Available from: <http://img2.creative-diagnostics.com/pdf/DEIA10583,Exendin-4.pdf>

26. Koliaraki V, Marinou M, Vassilakopoulos TP, Vavourakis E, Tsochatzis E, Pangalis GA, et al. A novel immunological assay for hepcidin quantification in human serum. *PLoS One.* 2009;4(2):e4581.

Recibido en enero de 2014.

Aprobado en julio de 2014.