



Validación de un ELISA para la Cuantificación del Anticuerpo Monoclonal CBIFN α 2.3 usado en la cuantificación del Interferon Alfa Humano Recombinante.

Autores: Yeleiny Machín, Reinaldo Blanco, Carlos Hernández, Liudmila Benítez, Maylin Castellanos, Dayamí Dorta, Ivis Pasarón, Shaylí Pérez, Vladimir Leal, Raúl Armas, Mónica Navarro, Oscar Cruz, Yunaisy Jiménez, Yusniel Cabrera, Joaquín González, Maylín LaO, Rodolfo Valdés

Introducción

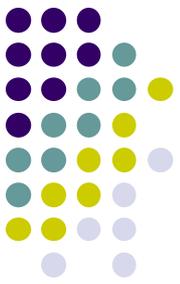
El Interferón Alfa Humano Recombinante (rec-hIFN α 2b) es utilizado como ingrediente farmacéutico activo de productos farmacéuticos como el Heberon Alfa R® y HeberFeron® producidos por el CIGB de La Habana. El proceso de biofabricación aplicado para purificar esta molécula debe ser monitoreado continuamente, mediante un Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima específico (ELISA) que utiliza el anticuerpo monoclonal CBIFN α 2.3 como principal reactivo biológico. Sin embargo, este AcM reconoce un epítipo conformacional en la molécula rec-hIFN α 2, lo que constituye un problema para monitorear la producción del AcM CBIFN α 2.3 y, por lo tanto, una dificultad para la cuantificación precisa de rec-hIFN α 2b. Una solución adecuada para este inconveniente podría ser la adición de una etapa de inhibición en el ELISA de cuantificación del AcM CBIFN α 2.3.

Por tanto, el objetivo del presente estudio es describir la validación de un ELISA para la cuantificación del AcM CBIFN α 2.3 con la adición de un paso de inhibición. Esto permitirá cuantificar los sobrenadantes de cultivo del hibridoma secretor del AcM CBIFN α 2.3; la selección del clon de mayor secreción y evaluar los diferentes lotes de producción del anticuerpo.

Principales parámetros de Validación: Precisión, Exactitud, Linealidad, Rango de cuantificación, Límite Detección y Cuantificación.



Principales Resultados de la Validación



Los resultados revelaron un coeficiente de variación intra e interensayo <20%, 100% de recuperación del AcM CBIFN α 2.3, un ajuste de datos a un modelo lineal con un coeficiente de regresión igual al 99.5%, un rango lineal entre 0.125 - 16.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ y 125 ng / mL como límite de cuantificación.

Table 1. Results of intra- and inter-assay CV in three days of experimentation of the precision study

Expected mAb Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	True mAb Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Days	Error	Intra-assay CV (%)	Inter-assay CV (%)
0.125	0.143	0.000	0.00005	5.3	5.3
0.250	0.236	0.000	0.001	13.4	13.4
0.500	0.452	0.000	0.0003	4.0	4.0
1.000	0.966	0.003	0.015	12.7	13.9
2.000	2.130	0.011	0.017	6.1	7.9
4.000	4.070	0.000	0.143	9.3	9.3
8.000	8.460	0.000	0.311	6.6	6.6
16.000	15.300	0.000	0.852	6.0	6.0

$$\text{Intra-assay CV} = (\sqrt{\sigma^2 \text{ error}/m}) \times 10^2$$

$$\text{Inter-assay CV} = (\sqrt{\sigma^2 \text{ days} + \sigma^2 \text{ error}/m}) \times 10^2$$



Table 2. Results of the accuracy analysis by means of the recovery results

Dilution of culture supernatant	Concentration of mAb mixture (µg/mL)		Recovery** (%)
	Expected	True*	
No diluted	4.89	6.00	81.5
2	5.78	6.00	96.4
4	6.25	6.00	104.2
8	7.09	6.00	118.2
Average	6.00	6.00	100.1

*Theoretical addition of mAb concentration (4 µg/mL) and culture supernatant (2 µg/mL).

**True concentration/Expected concentration x 100

Table 3. Results of the quantification range analysis

Expected mAb Concentración (EC) (µg/mL)	Average True mAb Concentración (µg/mL)	Standard Deviation (SD)	CV (%)	Relative Error (RE) (%)
16	15.3	0.92	6.0	-4.2
8	8.46	0.56	6.6	5.7
4	4.07	0.38	9.3	1.8
2	2.13	0.16	7.6	6.3
1	0.966	0.132	13.7	-3.4
0.5	0.451	0.017	3.8	-9.7
0.25	0.236	0.030	12.8	-5.7
0.125	0.143	0.013	9.4	14.7

CV = SD/TCx100; RE= (TC-EC)x100/EC

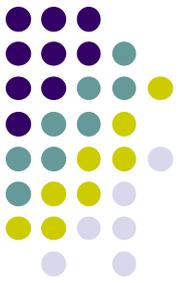
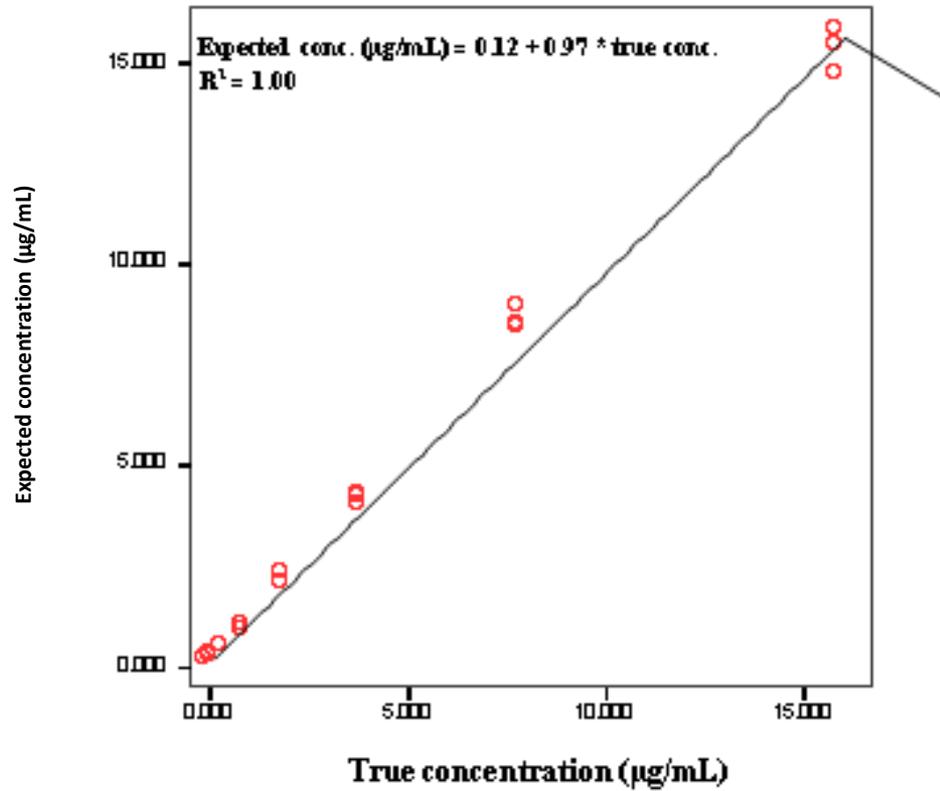


Figure 1. Correlation between expected and true CBIFN α 2.3 mAb concentration



Conclusiones:



El rec-hIFN α 2b producido por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, se cuantifica con precisión y exactitud mediante un ELISA que utiliza el AcM CBIFN α 2.3 como reactivo principal, cuantificado previamente por un ELISA de inhibición validado en este estudio. Por lo tanto, la validación de esta técnica analítica juega un papel fundamental en la producción farmacéutica del rec-hIFN α 2b, para la liberación de los diferentes lotes del producto (**Heberon Alfa R®**, **HeberFeron®** y **Nasalferon®**). Así como, para estudios de estabilidad a largo plazo del medicamento y reducir los efectos secundarios producidos por la aplicación de una dosis no bien cuantificada del rec-hIFN α 2b en el tratamiento de enfermedades crónicas prolongadas.