

Validación de enzimoimmunoanálisis escalonados para la inmunogenicidad del antineoplásico CIGB-370 en fase clínica inicial

► Damián Mainet-González^{1ab*}, Sheila Padrón-Morales^{2ac}, Martha Pupo-Peña^{3ad}, María Rosario Aleman-Miranda^{4ad}, Diamile González-Roche^{5ae}

¹ Médico Especialista en Primer Grado en Bioquímica Clínica e Investigador agregado. (ORCID: 0000-0001-6035-6824)

² Licenciada en Bioquímica y Maestría en Ciencia de Bioquímica.

³ Licenciada en Química, Tecnóloga de Primer Nivel, Maestría en Ciencia de Aseguramiento de la Calidad.

⁴ Licenciada en Microbiología.

⁵ Licenciada en Bioquímica, Tecnóloga de Primer Nivel. Maestría en Ciencia de Bioquímica.

^a Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB). Cubanacán. La Habana, Cuba.

^b Departamento de Farmacogenómica de la Subdirección de Investigaciones Biomédicas.

^c Departamento de Analítica de la Subdirección de Desarrollo del CIGB.

^d Departamento de Formulación y Envase de la Subdirección de Desarrollo del CIGB.

^e Departamento de Biología Molecular de la Subdirección de Desarrollo del CIGB.

*Autor para correspondencia.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Resumen

El CIGB-370 es un polipéptido recombinante antiangiogénico y antimetastático *in vitro* y antiproliferativo *in vivo* en modelos de ratones xenotransplantados con células tumorales humanas. La respuesta de anticuerpos de esa biomolécula bacteriana puede provocar reacciones adversas y alterar la eficacia del medicamento durante su estudio en seres humanos. Se realizó la validación de dos inmunoensayos escalonados, heterogéneos, con el CIGB-370 recubierto directamente en la fase sólida y revelados con proteína A-peroxidasa: uno de pesquisaje y otro competitivo de confirmación de la especificidad. Con esos inmunoensayos se evaluaron retrospectivamente muestras de plasma de 18 pacientes con cáncer que recibieron tres dosis de CIGB-370 (1,8; 3,7; y 6,1 mg/m²) endovenoso durante una hora, dos veces por semana durante cuatro semanas. Con los umbrales de corte fluctuantes de pesquisaje y de confirmación calculados, estos inmunoensayos detectaron anticuerpos anti-CIGB-370 y no otros contaminantes del proceso, del producto o de la matriz biológica. Los coeficientes de variación intra e interanálisis de los inmunoensayos fueron menores de 20%. La sensibilidad de esos inmunoensayos permitió la detección de una prevalencia de los anticuerpos anti-CIGB-370 mayor del 82% con predominio de los pacientes con anticuerpos inducidos sobre los pacientes con anticuerpos preexistentes. Esta metodología escalonada de inmunoensayos con una adecuada sensibilidad, especificidad, selectividad y precisión detecta un aumento de la prevalencia de anticuerpos anti-CIGB-370 en pacientes con cáncer tratados con el CIGB-370 con o sin modificaciones estructurales en un ensayo clínico inicial y favorece el estudio de la relevancia clínica de esos anticuerpos.

Palabras clave: Antineoplásicos; Formación de anticuerpos; Enzimoimmunoanálisis; Estudios de validación

Validation of staggered enzyme immunoassays for the immunogenicity of anticancer drug CIGB-370 in early trials

Abstract

The CIGB-370 recombinant polypeptide is antiangiogenic and antimetastatic in vitro and antiproliferative in vivo in xenograft mouse models with human tumor cells. The antibody response of this bacterial biomolecule can cause

adverse reactions and alters the effectiveness of the drug during its study in humans. The validation of two tiered heterogeneous immunoassays with CIGB-370 coated directly on the solid phase and revealed with protein A-peroxidase was performed. One was a screening immunoassay and the other was a competitive immunoassay confirming of specificity. With these immunoassays, plasma samples were evaluated. These samples were extracted in a retrospective clinical trial of 18 cancer patients who received an infusion of three doses of CIGB-370 (1.8, 3.7, and 6.1 mg/m²) intravenously over 1 hour, twice in a week for 4 weeks. The calculated screening and confirmation cut-point were floating. These immunoassays detected antibodies to CIGB-370 and not to other contaminants of process or product or of human plasma. The intra- and inter-assay coefficients of variation of the immunoassays were less than 20%. The sensitivity of these immunoassays allowed for the detection of a prevalence of anti CIGB-370 antibodies higher than 82%. The prevalence of patients with induced antibodies was significantly higher than that of patients with pre-existing anti-CIGB-370 antibodies. This tiered immunoassay methodology with adequate specificity, sensitivity, selectivity and precision allows for the detection of anti-CIGB-370 antibodies in cancer patients treated with CIGB-370 with or without structural modifications in an initial clinical trial and makes it possible to study clinical relevance of these antibodies.

Keywords: Antineoplastic agents; Antibody formation; Immunoassay techniques; Validation study

Validação de ensaios imunoenzimáticos escalonados para determinar a imunogenicidade do antineoplásico CIGB-370 em fase clínica inicial

Resumo

O CIGB-370 é um polipeptídeo recombinante antiangiogênico e anti-metastático *in vitro* e antiproliferativo *in vivo* em modelos de ratos xenotransplantados com células tumorais humanas. A resposta de anticorpos dessa biomolécula bacteriana pode causar reações adversas e alterar a eficácia do medicamento durante o seu estudo em seres humanos. Foram validados dois imunoenaios escalonados, heterogêneos, por etapas, com o CIGB-370 revestido diretamente na fase sólida e revelados com proteína A-peroxidase: um ensaio de pesquisa e um ensaio de confirmação da especificidade competitiva. Com esses imunoenaios foram avaliadas retrospectivamente amostras de plasma de 18 doentes com câncer que receberam três doses de CIGB-370 (1,8, 3,7 e 6,1 mg/m²) endovenoso durante uma hora, duas vezes por semana, durante quatro semanas. Com os limiares de interrupção flutuante e de confirmação calculados, estes imunoenaios detectaram anticorpos anti-CIGB-370 e não outros contaminantes do processo, do produto ou da matriz biológica. Os coeficientes de variação intra e inter-ensaio dos imunoenaios foram inferiores a 20%. A sensibilidade destes imunoenaios permitiu a detecção de uma prevalência dos anticorpos anti-CIGB-370 superior a 82% com predomínio dos doentes com anticorpos induzidos sobre doentes com anticorpos pré-existentes. Esta metodologia escalonada de imunoenaios com uma adequada sensibilidade, especificidade, seletividade e precisão deteta um aumento da prevalência de anticorpos anti-CIGB-370 em doentes com câncer tratados com o CIGB-370 com ou sem modificações estruturais em um ensaio clínico inicial e favorece o estudo da relevância clínica destes anticorpos.

Palavras-chave: Antineoplásicos; Formação de anticorpos; Ensaio imunoenzimático; Estudo de validação

Introducción

El cáncer pertenece al grupo de enfermedades crónicas no transmisibles que son la segunda causa de muerte a nivel mundial (1) y también en Cuba (2). Es la enfermedad que produce más años potenciales de vida perdidos en Cuba con 18,3 años/1000 habitantes de 1 a 74 años (2). En actualidad se están desarrollando medicamentos para combatir esta enfermedad, como las biomoléculas terapéuticas (BTP), que son polímeros de aminoácidos, hidratos de carbono o ácidos nucleicos con un tamaño molecular mayor que 1 a 3 kDa y que son sintetizados mediante microorganismos o células

humanas o no humanas. Estos medicamentos, que no incluyen a las vacunas, tienen mayor potencial de desarrollar una respuesta inmune que los medicamentos de moléculas más pequeñas (3). Esos anticuerpos pueden disminuir la eficacia mediante una alteración del perfil farmacocinético o farmacodinámico del medicamento o modificar su seguridad al causar efectos indeseables tales como reacciones de hipersensibilidad o anemias graves (4) (5) (6). Por esas razones es importante el estudio de la inmunogenicidad de las BTP en el proceso de desarrollo de medicamentos.

Los métodos bioanalíticos para el estudio de la inmunogenicidad de las BTP incluyen: los inmunoen-

sayos en fase sólida y en fase soluble, las resonancias plasmáticas de superficie, los ensayos de citotoxicidad, la reacción en cadena de la polimerasa inmune y la captura inmune con la espectrometría de masa y la cromatografía líquida (7) (8) (9). Los métodos más frecuentemente usados en la detección de anticuerpos contra la mayoría de las BTP son los enzimoanálisis (EIA) en fase sólida, porque son robustos, sensibles y compatibles con reactivos genéricos, instrumentos y equipamientos ya disponibles en muchos laboratorios (7) (10).

Se ha realizado con EIA el estudio de la inmunogenicidad del antineoplásico asparaginasa de origen bacteriano obtenido por vía recombinante (140 kDa, Medac®, Alemania), que se emplea en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (11). Este grupo de investigación ha tenido experiencia en estudiar la inmunogenicidad de la estreptoquinasa recombinante expresada en *Escherichia coli* (43 kDa, Heberkinasa®, Cuba) y de la estreptoquinasa natural de origen bacteriano (Streptase, Alemania) en el tratamiento del infarto de miocardio agudo por vía endovenosa, en pacientes de un ensayo clínico en fase III mediante un EIA en la detección de inmunoglobulina G (IgG) (12) y después en la trombosis hemorroidal aguda, donde hubo una disminución en la respuesta de anticuerpos cuando se administró por vía rectal (13). El CIGB-370 es una BTP polipeptídica de origen bacteriano recombinante de 26 kDa expresada en *Escherichia coli*, con actividad antiangiogénica y antimetastásica *in vitro* y antiproliferativa *in vivo* en ratones inmunodeprimidos xenotransplantados con células tumorales humanas (14). También mediante EIA, este candidato terapéutico fue evaluado en su inmunogenicidad en ratones BALB/c (15) que recibieron por vía subcutánea 8 administraciones en días alternos de las dosis de 27 y 114 mg/m² de CIGB-370. El 65,6% de esos animales a los 15 días de tratamiento desarrollaron títulos de IgG entre 1/100 y 1/5000.

El objetivo de la detección y caracterización de anticuerpos contra la BTP es encontrar correlaciones entre la inmunogenicidad y los eventos clínicos. Por esta razón, los métodos bioanalíticos deben ser adecuadamente desarrollados y validados. La validación es un proceso de investigaciones de laboratorio para la verificación de que ese método detectará consistentemente y de manera reproducible cantidades suficientemente bajas de anticuerpos específicos con respecto al BTP, en una matriz biológica compleja como es el plasma. Como un simple análisis no puede suministrar toda la información necesaria en el perfil de inmunogenicidad de una BTP, se aplica una estrategia escalonada con tres ensayos: pesquisaje, confirmatorio y de caracterización (títulos, isotipos, afinidad y neutralización) de los anticuerpos (4) (6). En este trabajo se describe la validación de una estrategia escalonada para determinación de los anticuerpos anti-CIGB-370 en plasma:

un primer EIA de pesquisaje para determinar anticuerpos anti-CIGB-370 (IgG, IgA e IgM mediante un conjugado de proteína A peroxidasa) y un segundo EIA de inhibición para la confirmación de la especificidad de esos anticuerpos anti-CIGB-370. Por último, con esos dos EIA se evaluaron retrospectivamente las muestras de pacientes cancerosos tratados con el CIGB-370.

Materiales y Métodos

Análisis inmunoinformático del CIGB-370 para el reconocimiento de epítomos de linfocitos B y epítomos de linfocitos T, detección de similitud estructural con proteínas endógenas humanas y de animales de experimentación y estudio de alergenios

La secuencia aminoacídica del CIGB-370 se extiende desde la serina 230 (S₂₃₀) a la valina 487 (V₄₈₇) del dominio carboxilo terminal de la metaloproteasa serralisina p50 (PRZN-SERMA, EC 3.4.24.20, de 50 kDa) de la bacteria *Serratia marcescens* según la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica de Estados Unidos de América (EE.UU.). En esa base de datos también se realizó el estudio de similitud estructural con proteínas no redundantes endógenas humanas y de animales de experimentación con los programas: BLAST (siglas en inglés de herramientas de investigación de alineamiento local básico) y CD-search (siglas en inglés de investigación de dominios conservados) donde se consideraron los parámetros predeterminados (16). La identificación de epítomos lineales de células B y epítomos de células T se realizó mediante la Base de Datos de Epítomos Inmunes (17), con las herramientas de predicción de antígenos de Kolaskar & Tongaonkar, de accesibilidad de superficie de Emini y de eliminación de la inmunogenicidad (*Deimmunization*). En esta última herramienta se predice la eliminación de epítomos de células T mediante reingeniería de proteínas terapéuticas. En las dos primeras herramientas de predicción para epítomos lineales de células B se consideró el valor umbral de corte predeterminado igual a 1,000. El estudio combinado de los epítomos lineales y conformacionales de células B del CIGB-370 se realizó en el programa Ellipro (18) a partir de su estructura tridimensional predicha en el programa SWISS MODEL (19) que usó como molde la estructura tridimensional más actual de la proteína serralisina p50 (20). A través del programa Algpred 2.0 se hizo la predicción de proteínas alérgicas a través de una aproximación híbrida de tres métodos: el algoritmo de aprendizaje de máquina, la identificación emergente y con clases de motivos en secuencias biológicas y la investigación basada en BLAST y el reconocimiento de epítomos IgE (21).

Reactivos

Muestras de plasma de donantes de sangre y de pacientes con cáncer

Las muestras de plasma en citrato fosfato dextrosa de ocho donantes del banco de sangre del Hemocentro de CIMEQ (La Habana, Cuba) se unieron en partes iguales, se mezclaron y se filtraron por papel de filtro (Whatman 3M, EE.UU.) y fueron los controles negativos (CN) de anticuerpos anti-CIGB-370. Se recogieron muestras de sangre venosa con un tubo Vacutainer con ácido etilendiamintetracético (BD Vacutainer, Plymouth, Reino Unido) en diferentes tiempos: antes del tratamiento, y a las 2, 3, 4, 5 y 8 semanas de 18 pacientes enfermos de cáncer que participaron en el ensayo clínico dosis-respuesta multicéntrico fase I de tratamiento con el candidato terapéutico CIGB-370 desde 2016 hasta 2017. Esos pacientes recibieron una infusión de tres dosis de CIGB-370: 1,85 mg/m²; 3,7 mg/m² y 6,1 mg/m² endovenoso durante una hora, dos veces a la semana durante cuatro semanas. Se tuvieron en cuenta los principios enunciados en la Declaración de Helsinki para la evaluación de seres humanos como sujetos de investigación y la aprobación por los Comités de Ética de las instituciones participantes (22). Los procedimientos realizados fueron posteriores a la obtención del consentimiento informado de los pacientes y se preservó debidamente la privacidad de ellos. Todas las muestras se alicuotaron y se conservaron a -20 °C. Se usaron con 4 ciclos de congelación y descongelación como máximo. Después de cada descongelación las muestras fueron homogeneizadas y centrifugadas a 4000 x g durante 10 min antes de usar en el inmunoensayo.

Obtención de antígenos y anticuerpos

Los antígenos serralisina p50 (14), el CIGB-370 (23), las proteínas contaminantes de la cepa W3110 de *Escherichia coli* y los anticuerpos policlonales antiserralisina p50 en conejo fueron suministrados por el departamento de Desarrollo (CIGB de La Habana, Cuba). Brevemente, el CIGB-370 se obtuvo como ingrediente farmacéutico activo (CIGB-370i) a partir de la solubilización de los cuerpos de inclusión en el citoplasma de las células hospedadoras, su renaturalización con detergentes y calcio y la ulterior purificación por cromatografías de intercambio aniónico y catiónico (24). Ese CIGB-370i se obtuvo con una pureza de 96% en electroforesis en gel de poli(acrilamida). Al CIGB-370i se le añadieron algunos aditivos (un hidrato de carbono simple y un aminoácido) para la liofilización en su formulación final y se conservó a 4 °C. Para la realización de este trabajo el CIGB-370 liofilizado se reconstituyó en agua destilada para una concentración de 1 mg/mL (CIGB-370f). El excipiente, formado por el tampón y los aditivos em-

pleados en la liofilización de la formulación final sin CIGB-370, se reconstituyó en igual volumen que el CIGB-370f. Las proteínas contaminantes del hospedador (*Escherichia coli* cepa W3110) se obtuvieron a partir de bacterias transformadas con el plásmido que no contenía el gen que codifica para la BTP: pTrcHisA (CIGB, La Habana, Cuba) y se purificaron de manera similar al CIGB-370i, pero sin realizar los pasos cromatográficos de intercambios iónicos. La serralisina p50 fue utilizada para la obtención del control positivo de anticuerpos policlonales antiserralisina p50 en conejo (CP) mediante la inmunización con adyuvante completo e incompleto de Freund (Sigma, St Louis, EE.UU.) (25). La purificación de los anticuerpos del suero de uno de los conejos mediante cromatografía de afinidad con proteína A presentó una pureza de 97,5% en electroforesis en gel de poli(acrilamida) y dodecil sulfato de sodio (26). Se cumplieron los principios éticos universales para la experimentación en animales de laboratorio y se contó con la aprobación del protocolo de investigación por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación del CIGB (27). Todos los reactivos anteriores se alicuotaron para evitar los ciclos de congelación-descongelación y se conservaron a -45 °C.

Metodología escalonada de enzimoimmunoanálisis para la detección de anticuerpos anti-CIGB-370 en plasma

Optimización del recubrimiento del enzimoimmunoanálisis de pequisaje de anticuerpos anti-CIGB-370 (primer escalón)

El EIA de pesquisaje fue indirecto, heterogéneo y no competitivo. Brevemente, las placas de microtitulación de 96 pozos de fondo plano PolySorp y MaxiSorp (Nunc, Thermo Scientific, Nueva York, EE.UU.) se recubrieron con 10 µg (100 µL/pozo) del polipéptido recombinante CIGB-370i y CIGB-370f diluido en el tampón fosfato salino (TFS) 0,15 M pH 7,2 y se incubaron por 16 h a 4 °C. Después se les realizaron tres lavados con una solución de Tween-20 al 0,05% (v/v). Posteriormente, a las placas se les aplicaron 200 µL/pozo del tampón de bloqueo de TFS con leche descremada (Pronadisa, Madrid, España) 3% (m/v), Tween-20 0,05% (v/v) durante 1 h a 37 °C y se lavaron cuatro veces con la solución de lavado. El CP se añadió a diferentes concentraciones diluido en el tampón de bloqueo y en la mezcla de plasma de donantes de sangre al 2,5% (v/v) concentración final. Las muestras de los pacientes, de los donantes de sangre y el CN se diluyeron 1/40, que es la mínima dilución que requiere el plasma para disminuir su interferencia. Al final se aplicaron 100 µL/pozo por duplicado de esas muestras a la placa de microtitulación. Las placas se incubaron durante 1 h a 37 °C y posteriormente se lavaron cuatro veces con la solución

de lavado. A continuación se añadieron 100 μL /pozo de la solución de proteína A conjugada con peroxidasa (CIGB de Sancti Spiritus, Cuba) diluida 1/64 000 en el tampón de bloqueo y las placas se incubaron 1 h a 37 °C. Después de lavar las placas cuatro veces con la solución de lavado, la reacción enzimática fue desarrollada con 1,2 mg de tetrametilbencidina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EE.UU.) disuelta en 100 μL de dimetilsulfóxido, que se añadió a 12 mL de tampón citrato fosfato 0,29 M pH 5,5 y 12 μL de peróxido de hidrógeno al 30% v/v (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EE.UU.) y se aplicaron 100 μL por pozo. A los 10 minutos de esa reacción en la placa de microtitulación protegida de la luz, se aplicaron 50 μL de ácido sulfúrico 2 M para detener la reacción. Finalmente, se leyó la absorbancia a 450 nm en el lector de placas de microtitulación SUMA PR0621 (TecnoSuma SA, La Habana, Cuba). Se calculó la razón de absorbancias del CP/CN y las absorbancias del CN como los dos parámetros a estudiar en la validación de este inmunoensayo. Los reactivos no especificados eran de calidad analítica (Merck, Darmstadt, Alemania).

EIA de confirmación de la especificidad (segundo escalón) y de titulación (tercer escalón) de anticuerpos anti-CIGB-370 en plasma humano

Este EIA es igual al descrito anteriormente, excepto que las muestras de los pacientes y de los donantes de sangre y los CN y los CP se preincubaron con una concentración en exceso de CIGB-370 en el diluyente en solución a 37 °C durante 1 h. Luego, las muestras con y sin CIGB-370 añadido se aplicaron 100 μL /pozo por duplicado en la placa de microtitulación recubierta y bloqueada y se incubaron durante 1 h a 37 °C. El resto del protocolo se siguió igual tal como fuera descrito anteriormente. Se calculó el porcentaje de inhibición = $100 \times [1 - (\text{absorbancia de la muestra con la BTP añadida} / \text{absorbancia de la muestra sin la BTP añadida})]$.

La concentración del CP a partir de la cual se produce una meseta en la curva dosis-respuesta de las concentraciones del analito *vs.* la absorbancia en el inmunoensayo constituye el CP alto. El EIA de titulación fue similar al inmunoensayo de pesquiasaje antes descrito, pero en este caso se realizaron diluciones del CP alto 1/40, 1/120, 1/360, 1/1080, 1/3240 y 1/9720 y se aplicaron por duplicado en el diluyente de la muestra. Los títulos de interpolación son la recíproca de la mayor dilución de las muestras o de los CP que producen una absorbancia igual al umbral de corte. Los títulos fueron calculados a partir de la interpolación de la recta de mejor ajuste de un modelo de regresión lineal calculado por el método de cuadrados mínimos entre las absorbancias y el logaritmo decimal de la recíproca de las diluciones en serie del CP alto a nivel del umbral de corte de pesquiasaje.

Validación de los inmunoensayos enzimáticos de pesquiasaje, de confirmación y de titulación

En la confirmación del funcionamiento confiable y preciso de esa metodología de determinación de anticuerpos anti-BTP se tuvieron en cuenta las recomendaciones internacionales de inmunoensayos cuasi cuantitativos como son: la determinación del umbral de corte fluctuante de pesquiasaje y confirmatorio, la sensibilidad analítica y el efecto gancho, la especificidad analítica y la selectividad analítica, la precisión de los inmunoensayos de pesquiasaje, de confirmación y titulación y los criterios de aceptación de los controles de aprovechamiento del sistema (4) (5) (6) (7).

El umbral de corte de pesquiasaje y confirmatorio fue calculado en los siguientes pasos: a) se realizaron de 3 a 6 inmunoensayos de pesquiasajes y de confirmación en una misma corrida en días diferentes; b) se investigó si la distribución de frecuencias de las absorbancias (inmunoensayo de pesquiasaje) o porcentajes de inhibición (inmunoensayo de confirmación) de las muestras de individuos sin recibir tratamiento con la BTP en cada uno de los inmunoensayos fue normal; c) se realizó la evaluación de los valores extremos por el método estadístico de Grubbs de las absorbancias o los porcentajes de inhibición de las muestras de individuos sin recibir tratamiento con la BTP en cada uno de los inmunoensayos; si se detectaban esos valores se descartaban y se verificaba nuevamente que la distribución de frecuencias de los datos fuera normal; d) se calculó el umbral de corte de cada uno de los ensayos con la fórmula: $\text{media} + t_{n-1, \alpha} \times \text{desviación estándar (DE)}$ de las absorbancias o de los porcentajes de inhibición de las muestras de individuos sin recibir tratamiento con la BTP en cada uno de los inmunoensayos. La media corresponde al promedio aritmético. La letra *t* corresponde al parámetro de la distribución *t* de Student con un nivel de significación (α) de 0,05 (inmunoensayo de pesquiasaje) y 0,01 (inmunoensayo de confirmación); *n*-1, grados de libertad para un número de observaciones (*n*); e) se comparó la media y la DE de las absorbancias y de los porcentajes de inhibición de las muestras de individuos sin recibir tratamiento con la BTP en cada uno de los inmunoensayos por las pruebas estadísticas ANOVA de una sola vía y la prueba de Bartlett, respectivamente. En este estudio las medias de las absorbancias y los porcentajes de inhibición de los inmunoensayos de pesquiasajes y confirmatorios fueron diferentes y las DE iguales, por lo que se determinó un umbral de corte fluctuante; f) se demostró una alta correlación entre la media de las absorbancias de las muestras negativas para anticuerpos anti-CIGB-370 de individuos sin recibir tratamiento con la BTP y el promedio de las absorbancias del CN en varias corridas de los inmunoensayos; g) se calculó un factor de normalización aditivo a partir de la sustracción al umbral de corte promedio ponderado, la media

ponderada de las absorbancias o de los porcentajes de inhibición del CN de cada uno de esos inmunoensayos; h) al promedio del CN de cada inmunoensayo se le adicionó el factor de normalización aditivo de pesquiasaje o confirmatorio y se obtuvo el umbral de corte fluctuante de cada tipo de inmunoensayo.

La sensibilidad analítica se obtuvo construyendo una curva de calibración de CP (desde 4000 ng/mL a 3,5 ng/mL) con diluciones seriadas al medio hasta que bordeara el umbral de corte de pesquiasaje en al menos tres corridas independientes realizadas por un analista y leída en un equipo. Luego, se interpoló la recta de mejor ajuste de un modelo de regresión lineal calculado por el método de cuadrados mínimos entre las absorbancias y el logaritmo decimal de las concentraciones de esa curva patrón a nivel del umbral de corte de pesquiasaje. La sensibilidad, con un 95% de certeza, se estimó a partir de la media de la sensibilidad analítica de cada ensayo $+ t_{(0,05; n-1)} \times DE$.

La concentración del analito del CP bajo correspondió al promedio de la sensibilidad analítica de tres ensayos $+ t_{(0,01; n-1)} \times DE$. Este CP bajo y el CP alto se diluyeron en la mezcla de plasma de donantes de sangre, se alicuotaron y se conservaron a -20 °C. Para analizar el efecto gancho se evaluaron concentraciones de anticuerpos superiores al CP alto diluido 1/40 (16, 32 y 128 µg/mL) que pudieran producir un resultado falsamente negativo.

La especificidad analítica se estudió en un inmunoensayo de inhibición donde en el paso de las muestras, al CP alto y al CN diluido 1/40 en el tampón diluyente se le añadieron diferentes concentraciones (100; 10; 1; 0,1; 0,01; y 0,001 µg/mL) del CIGB-370i y CIGB-370f y del excipiente o albúmina sérica humana (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y sin ninguna molécula añadida; se preincubaron durante 1 h a 37 °C y luego se aplicaron a la placa de microtitulación. Se siguió el resto de los pasos como se describiera anteriormente. En otro experimento, a concentraciones de anticuerpos anti-BTP superiores al CP alto exploradas en el efecto gancho, se le añadieron las concentraciones del CIGB-370 que pudieran inhibir su absorbancia.

En la selectividad analítica se midió la interferencia debida a la BTP en estudio y a los componentes del plasma mediante un EIA de inhibición, donde al CP bajo y al CN se les añadieron diferentes concentraciones de CIGB-370f: 3200; 800; 200; 50; 12,5; 3,1 y 0 ng/mL y de las proteínas contaminantes del hospedador, en las mismas concentraciones ya mencionadas, para explorar la interferencia de la BTP. Se preincubaron 1 h a 37 °C y luego se aplicaron a la placa de microtitulación recubierta con el CIGB-370 y se continuó con el resto de los pasos como se describiera. La selectividad analítica relacionada con la interferencia de la matriz biológica se estudió en el inmunoensayo de inhibición cuando a la concentración del CP alto se le

añadió el plasma de un paciente enfermo de cáncer, el plasma de siete donantes de sangre, la mezcla de plasma de donantes de sangre (CN) y el diluyente de las muestras.

Para la precisión de los inmunoensayos de pesquiasaje y de confirmación, los CN, CP alto y CP bajo fueron probados en tres días diferentes por un analista en un solo instrumento de lectura. Cada placa incluía tres lotes independientes de los controles. Se calculó la media, la DE y el coeficiente de variación de la razón de absorbancias del CP alto/CN y del CP bajo/CN y las absorbancias del CN para el EIA de pesquiasaje y de los porcentajes de inhibición del CP alto, CP bajo y CN para el EIA de confirmación de la especificidad. A los resultados de precisión intra e interanálisis de cada uno de los controles se le fijó un índice de falla de 1% para determinar los criterios de aceptación de los controles: de una cola para el CN (promedio de las absorbancias o de los porcentajes de inhibición $+ t_{(0,01; n-1)} \times DE$) y de dos colas para la razón de absorbancias o porcentaje de inhibición del CP alto/CN y del CP bajo/CN (promedio de las razones de absorbancias o de los porcentajes de inhibición de los controles $\pm t_{(0,005; n-1)} \times DE$). Se calculó el coeficiente de ventana factor $Z = 1 - [(3 \times DE_{CPalto} + 3 \times DE_{CN}) / (media_{CPalto} - media_{CN})]$, a partir de las DE y las medias de las absorbancias o de los porcentajes de inhibición del CP alto y del CN (28).

La precisión de la titulación del CP alto en el EIA de pesquiasaje se realizó en tres lotes diferentes en tres ensayos diferentes (con un total de ocho determinaciones). Se calculó la media, la DE y el coeficiente de variación de los títulos del CP alto. A partir de esas determinaciones se calculó la razón mínima significativa (RMS) de un aumento estadísticamente suficiente de los títulos, después con respecto a antes de recibir el tratamiento con la BTP, mediante la fórmula $RMS = 10^{t(n-1; 0,05) \times \sqrt{DEg}}$, donde DEg es la desviación estándar global que incluye la variación intra e interanálisis (29).

Evaluación retrospectiva de muestras de pacientes tratados con el CIGB-370 para la determinación de anticuerpos anti-CIGB-370

Las muestras de los pacientes se evaluaron primero en el EIA de pesquiasaje como reactivas y negativas y luego, las muestras reactivas como positivas y negativas en el EIA de confirmación de la especificidad. En ambos inmunoanálisis las razones de absorbancias del CP alto/CN y CP bajo/CN y los porcentajes de inhibición de los CP alto y CP bajo cayeron en el intervalo de aceptabilidad de cada uno de esos controles (Tabla I). Las muestras con resultados negativos antes y después del tratamiento fueron consideradas de pacientes con una respuesta inmune negativa. Si esas muestras negativas dieron positivas después de tratamiento, fueron de pa-

Tabla 1. Resumen de los parámetros de validación de los enzimoimmunoanálisis de pesquisaje y confirmación de la especificidad de anticuerpos anti-CIGB-370 en plasma humano

Parámetros de validación	Variables	Enzimoimmunoanálisis	
		Pesquisaje	Confirmatorio
Umbral de corte fluctuante		abs, n=3	% inhib, n=6
	udc pond	0,095	46
	CN pond	0,081	19
	FN	0,014	27
Sensibilidad analítica (95% de consistencia)	anti-BTP (ng/mL)	n=4	n=4
	en plasma	2749	2791
	en diluyente	68,7	69,8
Precisión intraanálisis	Controles	razón de abs CP/CN (% CV) n=3	% inhib (% CV) n=4
	CPa (160 µg/mL)	18,3 (11,1)	94,8 (0,4)
	CPb (4,7 µg/mL)	1,8 (4,6)	50,8 (3,7)
Precisión interanálisis	Controles	razón de abs CP/CN (% CV) n=3	% inhib (% CV) n=3
	CPa (160 µg/mL)	16 (12,8)	94,3 (0,9)
	CPb (4,7 µg/mL)	1,5 (19,9)	54,9 (16,1)
Intervalos de aceptabilidad (99% de consistencia)	Controles	razón de abs CP/CN n=13	% inhib n=12
	CPa (160 µg/mL)	6,3-23,9	89,2- 96,2
	CPb (4,7 µg/mL)	0,5-3,4	21,5-78,3

abs: absorbancia; anti-BTP: concentración de anticuerpos antiserralisina p50; CN: control negativo; CP (a y b): control positivo (alto y bajo); FN: factor de normalización aditivo; n: número de observaciones; % CV: porcentaje de coeficiente de variación; % inhib: porcentaje de inhibición; pond: ponderado; udc: umbral de corte.

cientes con una respuesta inmune inducida. Las muestras que dieron positivas antes del tratamiento y luego dieron negativas fueron de pacientes con una respuesta inmune reducida. Un último caso fue: si las muestras dieron positivas antes y después del tratamiento fueron de pacientes con una respuesta inmune preexistente no modificada. Las muestras se diluyeron 1/40, 1/120, 1/360 y 1/1080. A las muestras no se les realizó la determinación de los títulos de anticuerpos por no disponerse del volumen suficiente.

Cálculo estadístico

En la comparación de dos muestras independientes se aplicó una prueba *t* de Student si se cumplía con una distribución normal. De lo contrario, se realizó una prueba *U* de Mann Whitney. En la comparación de dos muestras dependientes se aplicó una prueba *t* de Student pareada si se cumplía con una distribución normal. De lo contrario, se realizó una prueba de los rangos con signo de Wilcoxon. En la comparación de varias muestras se aplicó una ANOVA de una sola vía como prueba paramétrica y un análisis de Kruskal-Wallis como prueba no paramétrica con sus pruebas de comparación múltiple de Tukey y de Dunn, respectivamente. Las pruebas de homogeneidad de varianzas de Fisher y de Bartlett se

realizaron para la comparación de dos grupos y varios grupos de muestras, respectivamente. Para determinar si la distribución de la frecuencia de los datos era normal se realizó la prueba de Shapiro-Wilk. Se buscó la existencia de valores extremos en los datos por la prueba de Grubbs. En la asociación de datos paramétricos de variables continuas se empleó el coeficiente de correlación de momento-producto de Pearson (*r*) y el coeficiente de determinación (*R*²). Todos esos análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico GraphPad Prism versión 6.0 para Windows (GraphPad Software Inc., La Jolla California, EE.UU.). Se consideró como significativa en las pruebas de hipótesis de dos colas una *p*<0,05. La recolección y organización de los datos se realizó en el programa Microsoft Excel (Windows 2007, EE.UU.). En ese programa se preparó una hoja de cálculo que permitió la determinación de la recta de mejor ajuste de dos variables continuas (Aseguramiento de la Calidad del CIGB, Habana, Cuba). El promedio ponderado se calculó mediante la suma de los productos de cada promedio parcial por el número correspondiente de observaciones dividido por el número total de las observaciones en varios grupos. La comparación de varios grupos de muestras sobre una variable nominal se realizó con una prueba de *Chi* cuadrado (χ^2) para una tabla de contingencia múltiple. Se determinó la potencia estadística

(1- β) mediante el paquete estadístico G*Power versión 3.1.9.4 (Universidad Kiel, Alemania). La prevalencia de esos anticuerpos se determinó con la división del número de sujetos positivos para esos anticuerpos entre el número de sujetos evaluables en ese período, multiplicado por 100 (%).

Resultados

Análisis epitópico de linfocitos B y de linfocitos T del CIGB-370, su reactividad cruzada con proteínas endógenas humanas y de animales de experimentación y su característica alergénica

Se identificaron 17 regiones probables de ser epítomos de células B por los métodos basados en la secuencia aminoacídica del CIGB-370: 10 epítomos por el método de predicción de antígeno (Y_{17} - A_{35} , Q_{64} - A_{70} , F_{97} - G_{102} , G_{105} - V_{113} , D_{125} - N_{130} , N_{142} - G_{147} , D_{161} - D_{170} , F_{203} - F_{210} , E_{216} - N_{222} y V_{227} - G_{235}) y 7 epítomos por el método de accesibilidad superficial (Y_3 - G_{11} , A_{35} - D_{43} , F_{48} - G_{53} , T_{59} - Q_{64} , Y_{84} - F_{97} , W_{178} - G_{185} y F_{194} - S_{200}). En el método ElliPro para la predicción de epítomos conformacionales y lineales de células B basado en la estructura tridimensional del CIGB-370 se identificaron 9 regiones epitópicas lineales (M_1 - L_{22} , D_{24} - T_{44} , F_{48} - D_{55} , S_{58} - V_{66} , W_{71} - N_{76} , F_{182} - D_{187} , N_{195} - V_{227} , N_{233} - D_{241} y G_{248} - D_{255}). Solamente dos regiones probables de ser epítomos lineales de células B fueron solapados por los tres métodos de predicción: M_1 - T_{44} y S_{58} - A_{70} y cuatro regiones fueron solapadas por dos métodos de predicción: F_{48} - D_{55} , F_{97} - G_{102} , W_{178} - D_{187} y F_{194} - D_{241} (Fig. 1). Por el método ElliPro se predijeron 4 regiones epitópicas discontinuas de células B: una de 4 residuos aminoacídicos (con un índice epitópico: 0,938); la segunda con 36 residuos (0,744); la tercera con 76 (0,655); y la cuarta con 28 (0,625). El sitio activo antiproliferativo y antiangiogénico del CIGB-370 (G_{42} - S_{61} ; Fig. 1) fue reconocido por el análisis de epítomos lineales de células B (M_1 - T_{44} , F_{48} - D_{55} y S_{58} - A_{70}) y por el análisis de epítomos conformacionales de células B de la tercera región epitópica donde se reconocen aminoácidos que for-

man parte de la región central primaria (4 aminoácidos en N_{51} - L_{57}), y de los bordes de las regiones secundarias extendidas aminoterminal (6 aminoácidos en G_{42} - S_{50}) y carboxiloterminal (4 aminoácidos, S_{58} - S_{61}) de ese sitio activo (30). Se identificó una región en la secuencia primaria del CIGB-370 probable de ser un epítomo de células T: A_{158} - A_{172} (Fig. 1). No se encontró reconocimiento significativo con proteínas endógenas de seres humanos (*Homo sapiens*), de ratón (*Mus musculus*) y de conejo (*Oryctolagus cuniculus*). El dominio C terminal de la proteína serralisina de la bacteria *Serratia marcescens* (CIGB-370) tuvo similitud en el patrón aminoacídico con la toxina enterohemolisina de la bacteria *Escherichia coli*. Ambas presentaron motivos estructurales de unión de calcio y pueden provenir de un ancestro común en la evolución molecular. El CIGB-370 presentó una probabilidad muy baja de ser una proteína alergénica y de poseer epítomos de IgE.

Optimización del recubrimiento del CIGB-370 en los enzimoimmunoanálisis de detección de anticuerpos anti-CIGB-370 en plasma

El BTP CIGB-370i, cuando se recubre en placa MaxiSorp, produce una menor razón de absorbancias del CP/CN que cuando se recubre en la placa PolySorp (Fig. 2A). La biomolécula de CIGB-370i, cuando se recubre en placa MaxiSorp, produce mayores absorbancias del CN que cuando se recubre en la placa PolySorp (Fig. 2B). Esos resultados se repitieron con el recubrimiento con CIGB-370f en este inmunoensayo. La placa PolySorp se utilizó en los restantes experimentos de optimización y validación de estos inmunoensayos de evaluación de anticuerpos anti-CIGB-370. En la comparación de los recubrimientos con esas dos preparaciones del CIGB-370 en la placa PolySorp; el recubrimiento del CIGB-370i presentó iguales absorbancias del CN que el CIGB-370f (Mann-Whitney U=6; n=4; $p=0,657$). El recubrimiento de CIGB-370i presentó menores razones de absorbancias del CP/CN que el CIGB-370f (U=21, n=6, $p=0,03$), por lo que se decidió realizar el recubrimiento con el CIGB-370f en el resto de los experimentos de validación del ensayo.

```

1  MSYWSETNTG GDNGGHYAAA PLLDDIAAIQ HLYGANPSTR TGDITVYGFNS NTGRDFLSTT
61  SNSQKVIFFAA WDAGGNDFD FSGYTANQRI NLNEKSFSDV GGLKGNVSIAGVTIENAIG
121 GSGNDVIVGN AANNVLKGGG GNDVLFGGGG ADELWGGAGK DIFVFSAAASD SAPGASDWIR
181 DFQKGIDKID LSFNKEANS SDFIHFVDHF SGTAGEALLS YNASSNVTDL SVNIGGHQAP
241 DFLVKIVGQV DVATDFIV

```

Figura 1. Estudio inmunoinformático de epítomos lineales de linfocitos B (en negritas y subrayado) y los epítomos de linfocitos T (azul) en la secuencia aminoacídica del CIGB-370 y su sitio activo (con región central primaria en amarillo y las regiones secundarias extendidas en verde)

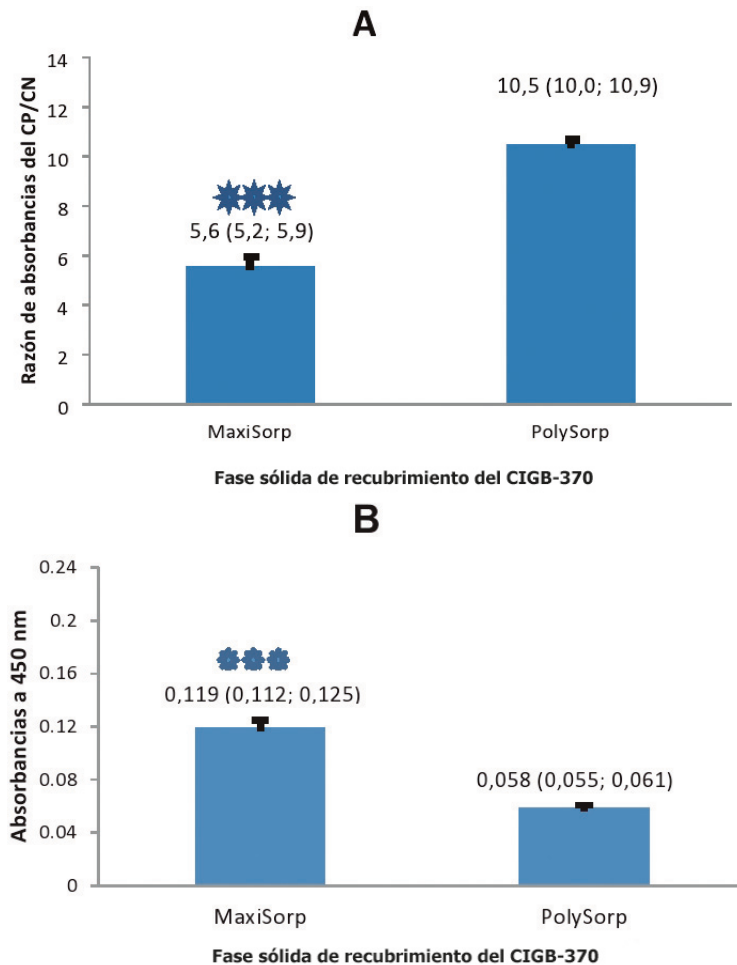


Figura 2. Comparación del recubrimiento del CIGB-370 en las placas de microtitulación MaxiSorp y PoliSorp de un enzimoimmunoanálisis de pesquiasaje de anticuerpos anti-CIGB-370 en plasma humano a través de la razón de absorbancias del control positivo/control negativo (CP/CN) en la Figura 2A y las absorbancias a 450 nm del control negativo (CN) en la Figura 2B. Las barras representan la media aritmética más el intervalo de confianza del 95%. Los asteriscos representan diferentes niveles de significación estadística (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ y ***, $p < 0,001$) de una prueba *t* de Student de comparación de medias aritméticas de dos grupos independientes (A: $t = -20,5$; $n = 8$ y B: $t = 19,8$; $n = 8$)

Validación de los inmunoensayos de pesquiasaje y de confirmación de la especificidad de anticuerpos anti-CIGB-370

Determinación del umbral de corte fluctuante de pesquiasaje y confirmatorio

Para determinar ese umbral de corte en los EIA de pesquiasaje y de confirmación se evaluaron 8 muestras de donantes de sangre y 18 muestras de pacientes con cáncer sin recibir tratamiento con CIGB-370. Las muestras que dieron por encima o igual al promedio de las absorbancias del CN +2xDE en el EIA de pesquiasaje fueron consideradas reactivas y, por debajo de esa absorbancia, negativas. Las muestras reactivas fueron evaluadas en el EIA de confirmación de la especificidad. Aquellas que tuvieron un valor mayor o igual que el promedio de los

porcentajes de inhibición del CN +2xDE fueron consideradas positivas y las que tuvieron un menor porcentaje de inhibición fueron consideradas negativas. Las muestras negativas por los inmunoensayos de pesquiasaje y de confirmación fueron 7 de 8 donantes de sangre y 14 de 18 de pacientes de cáncer sin recibir tratamiento con CIGB-370. Luego se demostró que no había diferencias significativas entre las medias ($t = 0,906$; $n_1 = 14$; $n_2 = 22$; $p = 0,371$) y las varianzas ($F = 1,58$, $n_1 = 14$; $n_2 = 22$; $p = 0,4$) de las absorbancias de las muestras de donantes de sangre con respecto a las muestras de pacientes con cáncer negativas para anticuerpos anti-CIGB-370 en el inmunoensayo de pesquiasaje. Por lo que las muestras de enfermos de cáncer y de donantes de sangre presentaron un umbral de corte similar (29) y, por otro lado, no fue posible calcular el umbral de corte a partir de las muestras antes del tratamiento de cada paciente por

tener algunos de ellos anticuerpos anti-CIGB-370 pre-existent (29) (31). Finalmente, debido a la disponibilidad de un volumen suficiente de plasma de muestras de 7 donantes de sangre y de un paciente enfermo de cáncer, esas muestras se emplearon para determinar el umbral de corte de ambos EIA.

En seis ensayos de pesquisaje realizados con las absorbancias de esas muestras todas tuvieron una distribución normal de frecuencias por la prueba de Shapiro Wilk; un valor extremo en tres muestras negativas de tres ensayos y un valor residual se descartaron del resto del análisis. Sin embargo, los porcentajes de inhibición de las muestras negativas para anticuerpos anti-CIGB-370 en seis ensayos confirmatorios independientes cumplieron con una distribución normal en escala lineal y sin valores extremos. Existieron diferencias significativas en la medias de las absorbancias de esas muestras en cuatro ensayos de pesquisaje por la ANOVA de una vía ($F(3, 49)=47,0$; $p<0,0001$). La prueba de homogeneidad de varianza de Bartlett no tuvo diferencias significativas entre las DE [estadígrafo Bartlett (corregido)=4,21; $p=0,24$]. Las medias de los porcentajes de inhibición de las muestras negativas tuvieron diferencias significativas entre los diferentes ensayos de confirmación [$F(5,81)=3,11$; $p=0,012$]. Sin embargo, las DE no variaron entre los ensayos [estadígrafo de Bartlett (corregido)=8,05; $p=0,15$], por lo que en ambos ensayos se decidió calcular un umbral de corte fluctuante. Existió una asociación alta entre el promedio de las muestras negativas de anticuerpos de individuos sin recibir tratamiento con el CIGB-370 y el promedio de las absorbancias del CN preparado con una mezcla de ocho muestras de donantes de sangre ($R^2=0,93$; $r=0,96$; $n=4$; $p=0,03$) y entre esas muestras negativas y el CN preparado con tres muestras (DS4, DS5 y DS8) de donantes de sangre ($R^2=0,99$; $r=0,99$; $n=4$; $p=0,006$). Esta última correlación fue más alta; a tal punto que ese nuevo CN explica el 99% de la variación del promedio de las absorbancias de las muestras negativas de donantes de sangre y un enfermo de cáncer. También ese nuevo CN preparado se utilizó en la evaluación de las muestras de los pacientes con cáncer en el ensayo de confirmación donde existió una asociación alta entre el promedio de los porcentajes de inhibición del nuevo CN preparado con esas tres muestras de donantes de sangre y el promedio de los porcentajes de inhibición de las muestras negativas para anticuerpos anti-CIGB-370 ($R^2=0,992$; $r=0,996$; $n=6$; $p<0,0001$). A partir del umbral de corte ponderado y el promedio ponderado de las absorbancias del CN se calculó el factor de normalización aditivo de los inmunoensayos de pesquisaje y confirmatorio (Tabla I).

Sensibilidad analítica y efecto gancho

La sensibilidad de los inmunoensayos de pesquisajes y confirmatorios con un 95% de consistencia (Tabla I)

no tuvieron diferencias significativas (Mann Whitney $U=8$; $n=4$; $p>0,99$). El efecto gancho se exploró a concentraciones 30 veces mayores que el CP alto y no se obtuvo una disminución o desaparición de la señal de absorbancia que pudiera generar un falso negativo en el inmunoensayo de pesquisaje de esos anticuerpos. También, a esa concentración de anticuerpos (128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se demostró que una concentración de CIGB-370f mayor o igual a 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en solución, era suficiente para inhibir las absorbancias de muestras de pacientes que tuvieran esas altas concentraciones de anticuerpos en el EIA de confirmación de la especificidad de los anticuerpos anti-BTP. La concentración de anticuerpos antiserralisina p50 del CP alto fue 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y la del CP bajo, 4,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en plasma humano.

Especificidad y selectividad analítica

El CIGB-370i, el CIGB-370f y el excipiente se compararon en sus características de inhibir la absorbancia del CP alto y el CN en un inmunoensayo de inhibición (Fig. 3). Existió inhibición específica de los anticuerpos anti-CIGB-370 del CP alto por ambas preparaciones del CIGB-370 y no ocurrió así con el excipiente ni con la albúmina sérica humana (en otro experimento) cuando se añadieron al CP alto.

En la selectividad analítica relacionada con la interferencia del BTP se produjo una disminución de la absorbancia del CP bajo por debajo del umbral de corte a partir 50 ng/mL de CIGB-370 en el inmunoensayo. Por esto, la tolerancia de este EIA fue de 12,5 ng/mL de CIGB-370 en el diluyente y de 500 ng/mL en el plasma, donde la concentración del BTP en solución todavía generó un resultado positivo. Sin embargo, las concentraciones aplicadas de proteínas contaminantes del hospedador no disminuyeron las absorbancias del CP bajo por debajo del umbral de corte de pesquisaje. Ambas proteínas, cuando son aplicadas en solución al CN, no aumentan sus absorbancias por encima del umbral de corte de pesquisaje. En la selectividad analítica relacionada con la interferencia de otros componentes de la matriz biológica se demostró que los recobrados de las absorbancias del CP alto en diferentes muestras de plasma, mezcla de plasmas y en el diluyente, se encontraban entre 90,5 y 116,7%. Esto confirmó la adecuada selección de la mínima dilución requerida del plasma y la ausencia de un efecto bloqueante de proteínas de la matriz biológica sobre el fondo de absorbancias del ensayo mayor que el diluyente de las muestras.

Precisión intra e interanálisis de los enzimoimmunoanálisis de pesquisaje y de confirmación

Los inmunoensayos de pesquisaje y de confirmación para la determinación de anticuerpos anti-CIGB-370 presentaron coeficientes de variación intra e interanálisis por debajo del 20% (Tabla I), igual que los coefi-

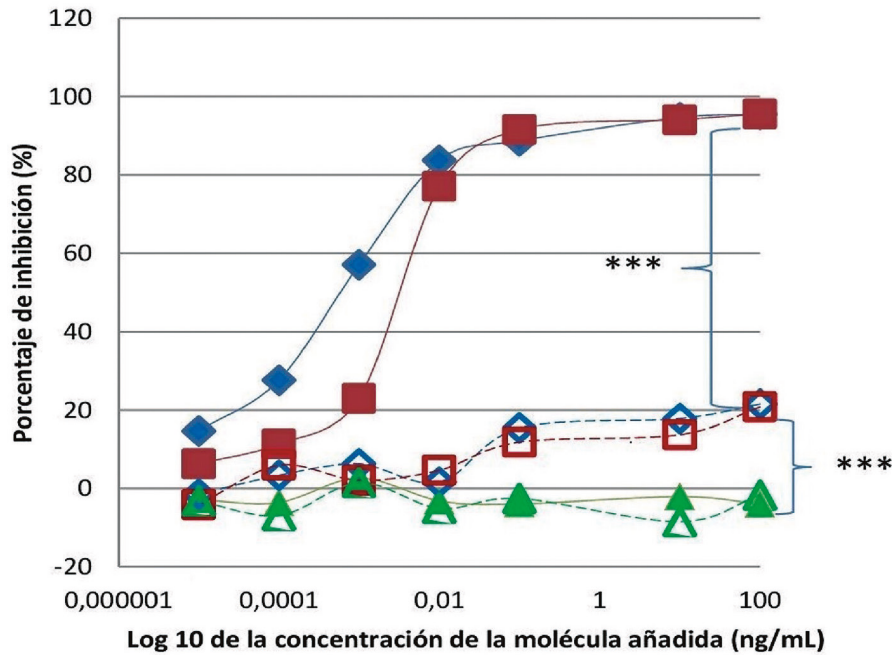


Figura 3. Comparación de los porcentajes de inhibición de la absorbancia del control positivo (marcadores sólidos y líneas continuas) y del control negativo (marcadores sin rellenos y líneas discontinuas) al agregar el ingrediente farmacéutico activo (rombo), la formulación final de CIGB-370 (cuadrado), excipiente (triángulo) en un ensayo de confirmación de la especificidad de anticuerpos anti-CIGB-370 en plasma humano. Los asteriscos representan diferentes niveles de significación estadística (*; $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ y ***, $p < 0,001$) de una prueba ANOVA [$F(5,30)=884$; $p < 0,001$] de una sola vía y una prueba de comparación múltiple de Tukey.

cientes de variación intraanálisis (3,5%) e interanálisis (15,8%) de los títulos de anticuerpos del CP alto (de 2515 a 2743) en los inmunoensayos de titulación ($n=3$). Los coeficientes de ventana (factor Z') estuvieron entre 0,5 y 1 en cinco inmunoensayos de pesquaje [con una media de 0,82 y un intervalo de confianza del 95% (IC95%) de 0,69 a 0,95] y cinco inmunoensayos de confirmación (0,87 con un IC95%: 0,8; 0,94), lo cual indica que son ensayos con un adecuado rango dinámico y una aceptable variabilidad para realizar sus funciones. La RMS entre los títulos posteriores con respecto a antes del tratamiento, para detectar la presencia de anticuerpos inducidos en las muestras con anticuerpos preexistentes en el EIA de titulación, fue 2,9.

Evaluación retrospectiva de muestras de pacientes tratados con el CIGB-370 mediante los enzimoimmunoanálisis validados

Se evaluaron 72 muestras de plasma de 18 pacientes con cáncer tratados con el CIGB-370 en un ensayo clínico en fase I. Hubo dos sujetos a los que se les tomaron muestras en la línea base, pero no hubo una determinación posterior al tratamiento: PC12 y PC15. El resultado de anticuerpos de esos pacientes se tuvo en cuenta en el cálculo de la prevalencia de anticuerpos

preexistentes y el resultado positivo del PC15 se incluyó en el estado de los anticuerpos (3). En el inmunoensayo de pesquaje se detectaron 63 muestras reactivas y 9 muestras negativas. En el inmunoensayo confirmatorio se diagnosticaron 39 muestras positivas para anticuerpos anti-CIGB-370 y 24 negativas. Se detectó un total de 33 muestras negativas para esos anticuerpos entre los dos inmunoensayos. La prevalencia global de pacientes positivos para anticuerpos anti-CIGB-370 [82,3%; IC 95% (56%, 96%); $n=17$; $p < 0,00001$; $1-\beta=1$] fue significativamente mayor que la prevalencia de pacientes negativos para esos anticuerpos (17,7%). De las muestras positivas para esos anticuerpos, los pacientes con anticuerpos inducidos [59%; IC95% (33%, 81%); $n=17$; $p=0,0045$; $1-\beta=0,89$] fueron significativamente más frecuentes que los pacientes con anticuerpos preexistentes (23%). La prevalencia parcial antes del tratamiento fue 22,2%. Las prevalencias parciales después del tratamiento oscilaron entre 46,6% y 77,8% desde la segunda y la octava semana, sin diferencias significativas entre ellas. Todas esas prevalencias parciales posttratamiento se diferenciaron significativamente de las determinaciones antes del tratamiento ($\chi^2=13,5$; grados de libertad=5; $p=0,04$). Esos dos últimos hallazgos indican que el tratamiento con el CIGB-370 en pacientes cancerosos aumenta la prevalencia de esos anticuerpos

anti-BTP. La frecuencia de pacientes con anticuerpos preexistentes anti-CIGB-370 no fue significativamente diferente de la frecuencia de donantes de sangre con esos anticuerpos (12,5%, n=8).

La mediana de tiempo de desarrollo de anticuerpos fue 2,5 semanas con un rango intercuartil entre 2 y 3 semanas de los sujetos con anticuerpos inducidos. La mediana de la cantidad de dosis en la que aparecieron los anticuerpos inducidos fue 3 dosis de la BTP con un rango intercuartil entre 2 y 4 dosis. Esta cinética de anticuerpos anti-CIGB-370 puede ayudar a optimizar el esquema de toma de muestras en estudios posteriores (3).

Los principales eventos adversos informados para las dosis estudiadas del CIGB-370 fueron: vómitos, náuseas, diarrea, epigastralgia, fiebre y cefalea de intensidad leve y resolución espontánea. No se encontró asociación de estos síntomas con la presencia de anticuerpos anti-CIGB-370 en los pacientes. No hubo reacciones adversas agudas como anafilaxia, síndrome de liberación de citoquinas ni reacciones de infusión en ninguno de los pacientes tratados. Los eventos adversos de intensidad grave estuvieron relacionados con la progresión de la enfermedad de base y no con la administración del CIGB-370.

Discusión y Conclusiones

Los EIA fueron la tecnología empleada para determinar anticuerpos anti-BTP en forma escalonada en esta primera fase clínica del estudio de tratamiento con el CIGB-370. De esos inmunoensayos se obtuvieron dos reactivos: el CP de anticuerpos anti-CIGB-370 en el conejo, que es un animal de experimentación cuyos anticuerpos tienen alta afinidad por la proteína A, y el conjugado de proteína A peroxidasa, que puede unirse en el mismo paso de revelado al CP en conejos como a las inmunoglobulinas humanas. Ese conjugado permite aumentar la detección de diferentes clases y subclases de las inmunoglobulinas humanas con buena afinidad: IgG₁, IgG₂, IgG₄, IgA₂ y con menor afinidad la IgM (32).

A estos métodos inmunoenzimáticos se les plantean tres desventajas: el enmascaramiento de epítopos del BTP cuando es absorbido directamente en la fase sólida, la presencia de fondos inespecíficos y el aumento del número de lavados que produce una pérdida en la detección de anticuerpos de baja afinidad (6). Para el primer aspecto se estudió el recubrimiento del CIGB-370 en dos tipos de fases sólidas bien caracterizadas: las placas de microtitulación Maxisorp y Polysorp. El recubrimiento del CIGB-370f y CIGB-370i fue mejor en Polysorp que en Maxisorp, tanto por tener una mayor razón de absorbancias del CP/CN como una menor absorbancia del CN. En la placa Polysorp se favorece la unión de proteínas y péptidos con predominio de los residuos de aminoácidos hidrofóbicos sobre los hidro-

filicos en su estructura y en la placa Maxisorp se favorece lo contrario (33). Este hecho sugiere la existencia de un mayor predominio de los residuos hidrofóbicos sobre los hidrofílicos en la estructura del CIGB-370 de ambas preparaciones en su unión a la placa Polysorp. El CIGB-370f en la unión a la placa de microtitulación de Polysorp tuvo mayor razón de absorbancias del CP/CN e igual absorbancia del CN que el CIGB-370i. También las muestras de pacientes positivas para anticuerpos anti-CIGB-370 tuvieron significativamente mayores absorbancias en el recubrimiento con CIGB-370f que con el CIGB-370i y las muestras negativas para esos anticuerpos tuvieron iguales absorbancias con ambos recubrimientos (datos no mostrados). Lo anterior sugiere que las moléculas de hidratos de carbono de la formulación final interactúan mejor con las moléculas de agua mediante los puentes de hidrógeno y el CIGB-370, con sus residuos hidrofóbicos, puede absorberse mejor en la fase sólida. Ambas preparaciones de CIGB-370 tienen igual exposición epitópica debido a que no se lograron diferencias significativas en los porcentaje de inhibición de esas dos preparaciones sobre el CP alto y el CN en el inmunoensayo de confirmación de la especificidad de los anticuerpos anti-CIGB-370. Las proteínas de la leche descremada del tampón de bloqueo y diluyente de las muestras se unieron bien en la fase sólida y no mostraron reactividad cruzada inesperada con el reactivo de detección y, conjuntamente con el detergente y el número de lavados, disminuyeron los fondos inespecíficos (34). Se logró bajar el fondo inespecífico hasta valores de absorbancia menores de 0,1 y al mismo tiempo mantener una buena razón de absorbancias del CP/CN y un adecuado coeficiente de ventana (factor Z').

La sensibilidad analítica da una comprensión global de cómo el inmunoensayo se desempeña, favorece la determinación de la concentración de anticuerpos anti-BTP que tiene el CP bajo y permite la comparación de varios métodos para determinar anticuerpos anti-BTP (7) (8) (31). El resultado de ese parámetro depende de la población de anticuerpos policlonales anti-BTP del CP y de cómo se obtuvo ese control. Durante la estandarización de los EIA con una fase sólida recubierta con CIGB-370i, los CP antiserralisina p50 para una misma concentración proteica generaron significativamente mayores absorbancias que los CP anti-CIGB-370 (datos no mostrados). Estos CP tienen una mezcla heterogénea de inmunoglobulinas de diferentes clases y subclases con diferentes afinidades y valencias en su unión a diferentes epítopos del antígeno para formar un complejo estable (avidez) y ninguno representa todo el espectro de la respuesta inmune humoral observada en cada uno de los sujetos tratados con la BTP. El CP antiserralisina p50 seleccionado influyó en la concentración necesaria de CIGB-370 para inhibir su absorbancia en el inmunoensayo de confirmación. Esas concentraciones fueron iguales o mayores que 35 µg/mL, pero en ensayos

de otros autores fueron menores, como 3 µg/mL (35) o 10 µg/mL (36). La existencia de muestras falsamente negativas debidas a un exceso de anticuerpos anti-BTP (efecto gancho), también depende de la mezcla de anticuerpos del CP y no se obtuvieron cuando se aplicaron concentraciones de anticuerpos de ese control tres veces mayores que una respuesta específica esperada del 10% de las concentraciones plasmáticas fisiológicas de IgG (12 mg/mL), IgA (3 mg/mL) e IgM (1,5 mg/mL) en los pacientes tratados (37). Además, para evitar ese efecto gancho se realizaron dos o más diluciones de las muestras de plasma de cada paciente. La aplicación del mismo formato del EIA de pesquisaje y de confirmación garantizó que ambos métodos tuvieran igual sensibilidad y que el CP bajo en ambos inmunoensayos presentara coeficientes de variación intra e interanálisis adecuados y un intervalo de aceptación de los CP por encima del umbral de corte de pesquisaje y de confirmación (31).

Esa sensibilidad analítica permitió la detección de una prevalencia de anticuerpos anti-CIGB-370 mayor del 82% en los pacientes tratados con la BTP. Esto concuerda con los resultados de los métodos inmunoinformáticos empleados que predijeron algunas regiones proteicas probables de ser epítomos de linfocitos B o T y pueden servir de guía a los investigadores en su búsqueda de epítomos verdaderos (17). La existencia de una prevalencia de anticuerpos antes de recibir tratamiento con la BTP (mayor de un 20%) parece estar relacionada con el contacto de esos pacientes y un donante de sangre con antígenos ambientales que comparten similitud estructural con la BTP y es menos probable que sea hacia proteínas homólogas endógenas humanas con dominios de similitud estructural, según el resultado del estudio inmunoinformático.

Un aspecto a favor de los EIA indirectos y tipo puente es la alta tolerancia a la presencia de la BTP en plasma (6) (7) (8) (31). Los estudios de interferencia de la BTP demostraron que la tolerancia del inmunoensayo fue de 500 ng/mL de CIGB-370 disuelto en plasma humano. Por esto, la toma de las muestras del ensayo clínico para el estudio retrospectivo de la inmunogenicidad se realizó antes de la aplicación endovenosa de la próxima dosis de CIGB-370 con un intervalo entre dosis de 72 h. Las concentraciones plasmáticas del CIGB-370 a dos veces su tiempo de vida media (62,3 h) administrado por vía endovenosa a 9 mg/m² fueron menores de 460 ng/mL en un estudio farmacocinético preclínico realizado en ratones BALB/c y C57BL6 (38).

Este candidato bioterapéutico está en su primera fase clínica de desarrollo donde se evaluó su seguridad. Se encontraron reacciones adversas ligeras gastrointestinales que sugieren estudios de la determinación de IgA en etapas posteriores. No se esperan riesgos de inmunogenicidad graves para los sujetos a los que se les indicará la BTP. Según el análisis inmunoinformático

el CIGB-370 arrojó una escasa probabilidad de provocar una reacción autoinmune o alérgica, debida a no tener similitud con proteínas endógenas y a no ser una proteína alergénica ni tener epítomos IgE en un programa con una exactitud predictiva mayor de 94% (21). Durante el ensayo clínico no hubo reacciones adversas agudas de anafilaxia en ninguno de los pacientes tratados. Todos esos aspectos están a favor de realizar una validación parcial de estos inmunoensayos para determinar la inmunogenicidad de esta BTP; por esa causa no se realizó la validación entre analistas ni se estudió la reproducibilidad entre laboratorios. Sin embargo, esa validación parcial permitió determinar la utilidad de estos EIA para tomar una decisión con respecto al proceso de desarrollo del CIGB-370 como candidato terapéutico del cáncer. A partir de ese resultado se trabaja en la reingeniería genética del CIGB-370 con vistas a aumentar los niveles de expresión y modificar la existencia de sus epítomos de células B y de células T. Por otra parte, se estudia la utilización de los péptidos del sitio activo del CIGB-370 de menor peso molecular, en ambos casos para disminuir la inmunogenicidad del CIGB-370 (30) (39), como se ha logrado disminuir la inmunogenicidad de la estreptoquinasa recombinante con la eliminación de 42 aminoácidos de su extremo C terminal (40), o la modificación covalente de la asparaginasa nativa de *Escherichia coli* con el polietilenglicol (método químico) o su expresión recombinante en la bacteria *Erwinia chrysanthemi* que disminuyen la reactividad cruzada entre esas moléculas y se aplican en diferentes líneas de tratamiento para mantener su eficacia y aumentar su seguridad en el tratamiento (41). Otras reacciones adversas que disminuyen su frecuencia por la modificación estructural de esos BTP y la disminución en la generación de anticuerpos anti-BTP son: las reacciones de infusión, las reacciones de complejos inmunes circulantes, las reacciones de hipersensibilidad celular retardada y la neutralización de su actividad biológica (3). El estudio inmunoinformático del CIGB-370 sugiere un reconocimiento probable de su sitio activo primario y de sus regiones secundarias extendidas por epítomos lineales y conformacionales de linfocitos B que inhiban la unión de esta biomolécula con su blanco terapéutico o eviten que durante el tratamiento crónico con el CIGB-370 ocurra una maduración de la respuesta inmune con aumento de la afinidad de los anticuerpos anti-BTP y una expansión del reconocimiento epitópico hacia a ese sitio activo.

En este trabajo se realizó la determinación de la precisión de la titulación del CP alto como una determinación cuasi cuantitativa de los niveles de anticuerpos que favorece encontrar correlación entre los parámetros clínicos de seguridad, eficacia, farmacocinética y farmacodinamia con los títulos de anticuerpos anti-BTP y su persistencia, cuando no se logra con la sola determinación de la incidencia de estos anticuerpos (31). Por otro

lado, se favorece la validación de estos inmunoensayos porque no se tienen que realizar los experimentos de paralelismo entre una curva calibración de un patrón de referencia comercial con el patrón del laboratorio ni demostrar el paralelismo entre las muestras a evaluar y la curva de calibración del patrón de referencia del laboratorio en la cuantificación absoluta de las concentraciones de anticuerpos anti-BTP (4). Sin embargo, en este trabajo no se realizó la titulación con las muestras de los pacientes debido a no disponer de un volumen necesario y no se pudo calcular la incidencia de esos anticuerpos en pacientes que tuvieron anticuerpos preexistentes. Por esto, se recomienda realizar la titulación de las muestras de los pacientes tratados con la BTP en otros ensayos clínicos, para comparar la inmunogenicidad del CIGB-370 no modificado respecto del modificado mediante reingeniería genética o química de proteínas. También se realizó la determinación de la RMS entre los títulos posteriores con respecto a los previos al tratamiento con la BTP, por el método de interpolación (RMS=2,9) que dio un valor menor que aquel reportado (3) para el método de titulación de punto final de diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ (RMS=4) y $\frac{1}{3}$ (RMS=9). En el primer método se estima los títulos de anticuerpos de las muestras en un intervalo de varias diluciones conocidas, y en el segundo se toma la mayor dilución del analito con una absorbancia inmediatamente superior al umbral de corte.

Esta es la primera evaluación de la inmunogenicidad de este candidato terapéutico en muestras humanas cuando no se cuenta con un modelo animal predictivo de ese aspecto. Se demostró que la formulación final del CIGB-370 se absorbe mejor a una fase sólida con predominio de los residuos hidrofóbicos sobre los hidrofílicos que su ingrediente farmacéutico activo (ambas preparaciones tienen igual exposición epitépica). El método de determinación de títulos de anticuerpos a través de la interpolación de la curva de dilución es más sensible en detectar anticuerpos inducidos en muestras con anticuerpos preexistentes de pacientes tratados con el CIGB-370 con respecto al método de titulación de punto final. La metodología de estos EIA escalonados con dos umbrales de corte fluctuantes no específicos de enfermedad, uno de pesquisaje y otro de confirmación; es precisa, selectiva, específica y sensible en detectar una prevalencia de anticuerpos anti-CIGB-370 mayor de 82% en pacientes tratados por vía endovenosa con el CIGB-370. En los pacientes con anticuerpos anti-CIGB-370 predomina la respuesta inmune inducida sobre la respuesta inmune preexistente. Ese resultado coincide con el hallazgo del estudio inmunoinformático de la existencia de epítomos de linfocitos B y epítomos de linfocitos T en el CIGB-370 que favorecen su inmunogenicidad. Esta estrategia escalonada de inmunoensayos puede estudiar la correlación de anticuerpos anti-CIGB-370 con los síntomas, la farmacocinética y los

riesgos clínicos en una muestra poblacional de tamaño estadísticamente suficiente de pacientes tratados con esa BTP (con y sin modificaciones estructurales) para encontrar la relevancia clínica de esos anticuerpos. Además de determinar la eficacia y la seguridad, se debe realizar el análisis necesario de costo/beneficio de las diferentes variantes terapéuticas del CIGB-370 con mayor impacto socioeconómico en los cuidados clínicos.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la investigadora Matilde Lopez Abad por el apoyo material en la realización de este trabajo y al personal médico y paramédico de los Hospitales cubanos Celestino Hernández (Villa Clara), Gustavo Aldereguía (Cienfuegos) y CIMEQ (La Habana) en coordinación con la Subdirección de Investigaciones clínicas del CIGB de La Habana por suministrar las muestras de los pacientes tratados con el CIGB-370.

Fuentes de financiación

El presente trabajo fue realizado con una financiación específica del CIGB.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto del presente trabajo.

Correspondencia

Dr. DAMIÁN MAINET GONZÁLEZ

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Ave 31 e/158 y 190 apartado postal 6162. Cubanacan. La Habana. Código postal 10600, Cuba.

Correo electrónico: damian.mainet@cigb.edu.cu

Referencias bibliográficas

1. Organización Mundial de la Salud. Cáncer: datos y cifras. 12 septiembre de 2018 [internet] Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (fecha de acceso: 18 de febrero de 2021).
2. Anuario Estadístico de Salud de Cuba. MINSAP. 2019. Dirección de Registros Médicos y Estadística de Salud. La Habana 2020 [internet] Disponible en: URL: <https://temas.sld.cu/estadisticassalud/2020/05/13/publicado-el-anuario-estadistico-de-salud-2019/> (fecha de acceso: 17 septiembre de 2020).
3. Shankar G, Arkin S, Cocea L, Devanarayan V, Kirshner S, Kromminga A, *et al.* Assessment and reporting of the clinical immunogenicity of therapeutic proteins and peptides-harmonized terminology and tactical recommendations. *AAPS J* 2014; 16 (4): 658-73.
4. Shankar G, Devanarayan V, Amaravadi L, Chen Barrett Y, Bowshere R, Finco-Kent D, *et al.* Recommendations for the validation of immunoassays used for detection

- of host antibodies against biotechnology products. *J Pharm Biomed Anal* 2008 Dec; 48 (5): 1267-81.
5. Rup B, Pallardy M, Sikkema D, Albert T, Allez M, Broet P, *et al.* Standardizing terms, definitions and concepts for describing and interpreting unwanted immunogenicity of biopharmaceuticals: recommendations of the Innovative Medicines Initiative ABIRISK consortium. *Clin Exp Immunol* 2015; 181 (3): 385-400.
 6. Wadhwa M, Knezevic I, Kang HN, Thorpe R. Immunogenicity assessment of biotherapeutic products: an overview of assays and their utility. *Biologicals* 2015; 43 (5): 298-306.
 7. Ishii-Watabe A, Shibata H, Nishimura K, Hosogi J, Aoyama M, Nishimiya K, *et al.* Immunogenicity of therapeutic protein products: current considerations for anti-drug antibody assay in Japan. *Bioanalysis* 2018; 10 (2): 95-105.
 8. European Medicines Agency (EMA). Guideline on Immunogenicity Assessment of Biotechnology-Derived Therapeutic Proteins. London, UK: EMA, 2015.
 9. Partridge MA, Purushothama S, Elango C, Lu Y. Emerging technologies and generic assays for the detection of anti-drug antibodies. *J Immunol Res* 2016 Jul; 2016: 6262383.
 10. Brummelen EM, Ros W, Wolbink G, Beijnen JH, Schellens JH. Antidrug antibody formation in Oncology: clinical relevance and challenges. *Oncologist* 2016; 21 (10): 1260-8.
 11. Asselin B, Rizzari C. Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. *Leuk Lymphoma* 2015 Aug; 56 (8): 2273-80.
 12. Mainet D, Del Rosario M, Toruncha A, Prats P, Valenzuela C, López Saura P. Similar, more than 6 months persisted, antibody and neutralizing activity responses in patients with acute myocardial infarction treated with recombinant or natural streptokinase. *Fibrinolysis and Proteolysis* 1998; 12: 301-9.
 13. Quintero L, Hernández-Bernal F, Marrero MA, Valenzuela CM, López M, Barcelona S, *et al.* Initial evidence of safety and clinical effect of recombinant streptokinase suppository in acute hemorrhoidal disease. Open, proof-of-concept, pilot trial. *Biotechnol Apl* 2010; 27: 277-80.
 14. Abrahantes-Pérez MC, Reyes-González J, Véliz-Ríos G, Martínez-Díaz E, Gasmuri-González CA, García-Suarez J, *et al.* inventores; Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, cesionario. Composición farmacéutica conteniendo fragmentos polipeptídicos de serralisinas. PCT/CU2005/000 003, WO 2006/005268 A2. 2006 enero 19.
 15. Castro-Velazco J, Abrahantes-Pérez MC, Alvarado-Luege M, Bequet M, Aldana-Velazco L. Informe sobre la evaluación de la respuesta humoral y de las subpoblaciones linfocitarias CD4 y CD8 en ratones BALB/c tratados con múltiples dosis del candidato antitumoral CIGB-370r. Ensayo preclínico-experimental. Código de estudio: CIGB-370-II-1407. Habana, julio 2014.
 16. NCBI Resource Coordinators. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res* 2016; 44(D1): D7-D19. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (fecha de acceso: 19 de noviembre de 2020).
 17. Vita R, Mahajan S, Overton JA, Dhanda SK, Martini S, Cantrell JR, *et al.* The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update. *Nucleic Acids Res* 2018 Oct 24. Disponible en: <https://www.iedb.org> (fecha de acceso: 27 de noviembre de 2020).
 18. Ponomarenko J, Bui HH, Li W, Fusseder N, Bourne PE, Sette A, *et al.* ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes. *BMC Bioinformatics* 2008 Dec 2; 9: 514.
 19. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 2018; 46, W296-303.
 20. Baumann U. Crystal structure of the 50 kDa metalloproteases from *S. marcescens*. *J Mol Biol* 1994; 242: 244-51.
 21. Sharma N, Patiyal S, Dhall A, Pande A, Arora C, Raghava GPS. AlgPred 2.0: an improved method for predicting allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Brief Bioinform* 2021 Jul 20; 22 (4): 1-12.
 22. Asociación Médica Mundial (AMM). Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Disponible en: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/> (fecha de acceso: 6 de noviembre de 2020).
 23. Garcia Suarez J. Diseño del proceso fermentativo del polipéptido antitumoral recombinante p25 expresado en *Escherichia coli* [Tesis de Doctoral. Facultad de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana]; La Habana: Editorial Universitaria, 2016.
 24. Palmer I, Wingfield PT. Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci* 2012 Nov; Chapter 6: Unit 6.3.
 25. Cooper HM, Paterson Y. Preparation of polyclonal antisera. *Current protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc.; 2000, 11.12.1-11.12.9.
 26. Harlow E, Lane D. Storing and purifying antibodies. En: *Antibodies: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988. p. 283-318.
 27. Molina-Martínez JL, Alonso-Villavicencio G, Pedraza Acevedo NM, Bequer-Mendoza L, Gómez-Hernández T, Sánchez-Álvarez C, *et al.* Algunas reflexiones sobre la Bioética en las investigaciones y la actitud humana frente a los animales. *Rev Electrón Vet* 2017; 18 (01) [26 pantallas]. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010117/011701.pdf>. (fecha de acceso 23 de septiembre de 2021).
 28. Zhang JH, Chung TD, Oldenburg KR. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen* 1999; 4 (2): 67-73.
 29. Kibbey MC. Immunogenicity assays-Design and validation of immunoassays to detect anti-drug antibodies. *Pharmacopeial Forum* 2015; 38 (3).
 30. Abrahantes Pérez MC, Chinae Santiago G, Martínez Díaz E, Garay Pérez HE, Reyes Acosta O, Lopez Mola

- E, *et al.*, inventores. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, cesionario. Los péptidos cíclicos con actividad antineoplásica y antiangiogénica. PCT/CU2012/000002. WO2012/126441 A2. 2012 septiembre 27.
31. Food and Drug Administration (US FDA). Guidance for Industry: Assay Development for Immunogenicity Testing of Therapeutic Proteins (Draft Guidance). Silver Spring, MD: FDA, 2019.
 32. Cooper HM, Paterson Y. Determination of specific antibody. Section V: Titer and isotype determination of specific antibody. *Curr Protoc Mol Biol* NY: John Wiley & Sons, Inc. 2000:11.17.1-11.17.13.
 33. Esser P. Principles in adsorption to polystyrene. Thermo Fisher Scientific Application notes. [Internet] 2015 Disponible en: <https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LCD/Product-Bulletins/D19559~.pdf> (fecha de acceso: 22 de octubre de 2020).
 34. Ochoa A, Martínez JC, Ferriol X, Estrada E, García AM, Blanco R, *et al.* Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *Vaccci Monitor* 2000; 3: 13-8.
 35. Inglehoven K, Kramer D, Jensen PE, Hermanrud C, Ryner M, Deisenhammer F, *et al.* Development and validation of an enzyme linked immunosorbent assay for the detection of binding antidrug antibodies against interferon beta. *Front Neural* 2017 Jul; 8: 305.
 36. Jani D, Nowak J, Chen Y, Boni J, Gorovits B. Assessment of clinical immunogenicity of inotuzumab ozogamicin in patients with non-Hodgkin lymphoma and acute lymphoblastic leukemia. *AAPS Open* 2018, 4:1 [14 pantallas]. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s41120-018-0021-5> (fecha de acceso: 22 de marzo de 2020).
 37. Delves PJ, Martin SJ, Burton DR, Roitt IM. Chapter 3. Antibodies in Roitt's Essential Immunology, Thirteenth Edition. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd. 2017: 69-96.
 38. Pimentel-González G. Informe sobre la biodistribución y la farmacocinética de la proteína CIGB 370. Laboratorio de Radiofarmacia. Instituto Nacional de Oncología y Radiología, 2016.
 39. Zinsli LV, Stierlin N, Loessner MJ, Schmelcher M. Deimmunization of protein therapeutics – Recent advances in experimental and computational epitope prediction and deletion. *Comput Struct Biotechnol J* 2021; 19: 315-29.
 40. Torrens I, Ojalvo AG, Seralena A, Hayes O, de la Fuente J. A mutant streptokinase lacking the C-terminal 42 amino acids is less immunogenic. *Immunol Lett* 1999; 70 (3): 213-8.
 41. Asselin B, Rizzari C. Asparaginase pharmacokinetics and implications of therapeutic drug monitoring. *Leuk Lymphoma* 2015; 56 (8): 2273-80.

Recibido: 14 de diciembre de 2023

Aceptado: 22 de julio de 2024