

Establecimiento y validación de un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA, empleado en el control de calidad del Interferón alfa 2b humano recombinante

Susset Valderrama, Eliana Pérez, Yurisleydis Aldama, Lourdes Costa, Marisel Quintana, Gudelia Pérez, Gerardo García

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave 31 e/ 158 y 190, Apartado Postal 6162, Ciudad de La Habana 10600, Cuba.

email: susset.valderrama@cigb.edu.cu

Se estableció y validó un ELISA para la cuantificación del Interferón alfa 2b humano recombinante en el Ingrediente Farmacéutico Activo, definiéndose los criterios de validez del ensayo y basado en el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio. Se evaluaron los parámetros de: linealidad, especificidad, exactitud, rango, precisión y robustez. El ensayo establecido resultó específico, con una exactitud entre 84,3% y 102,4%, se demostró un ajuste cuadrático y un rango de trabajo entre 1 y 10 ng/mL; la repetibilidad y la precisión intermedia mostraron coeficientes de variación inferiores al 10% y 20% respectivamente, y se comprobó la robustez del método con respecto al efecto borde y la estabilidad de las soluciones.

Palabras clave: ELISA, Interferón alfa 2b humano recombinante, Validación.

Introducción

Con el desarrollo de la industria biofarmacéutica y la obtención de nuevos productos por la tecnología del ADN recombinante, con aplicaciones en el campo de la salud humana y animal, se requiere del empleo de métodos de control de la calidad exactos, reproducibles y confiables, ya que la información brindada por éstos servirá de base para tomar decisiones sobre la seguridad y eficacia de dichos productos.

Los ensayos inmunoenzimáticos tipo ELISA (del inglés "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay"), son empleados actualmente en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) para el control de la calidad de productos biofarmacéuticos obtenidos por la vía del ADN recombinante, específicamente para la cuantificación e identificación de la proteína de interés en muestras de Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFA) y Producto Terminado (PT). Estos ensayos se caracterizan por una alta sensibilidad y reproducibilidad, además de tener como ventaja respecto a los métodos físico-químicos su alta especificidad, basado precisamente en la naturaleza de los enlaces antígeno-anticuerpo (1).

La validación de estas técnicas analíticas se hace necesaria para garantizar que se cumplan los requisitos para las aplicaciones deseadas, ya que en la industria farmacéutica es imprescindible contar con ensayos que garanticen la obtención de resultados confiables.

El Interferón alfa 2b humano recombinante es un importante modificador de la respuesta biológica y tiene efectos antiviral,

antiproliferativo e inmunomodulador. Se puede emplear como droga única o combinada con otros inmunoterapéuticos, como pudieran ser los candidatos vacunales que se encuentran en desarrollo. Se ha comprobado que ofrece una respuesta excelente a las enfermedades virales inmunológicas y neoplasias, además de mostrar un efecto antifibrótico.

En este trabajo se presenta el establecimiento y la validación de un ELISA para la cuantificación del Interferón alfa 2b humano recombinante (IFN alfa 2b hu-rec) en el IFA, basado en el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) (2).

Materiales y Métodos

Reactivos biológicos

Los Anticuerpos Monoclonales (AcM) CB - IFN 2.3 y CB - IFN 2.4 -PRP contra el IFN alfa 2b hu-rec, empleados como recubrimiento de las placas de ELISA y como conjugado respectivamente, fueron suministrados por el CIGB de Sancti Spiritus y se titularon según el Procedimiento Patrón de Operación 4.09.036.91 (3).

El Material de Referencia (MR) de trabajo para el IFN alfa 2b hu-rec, empleado como curva de calibración del ensayo, fue elaborado y suministrado por el Grupo de Estabilidad y Materiales de Referencia de la Dirección de Control de la Calidad. Se preparó una curva patrón con el MR, a partir de su concentración certificada, para obtener las concentraciones de 10, 5, 2, 1, y 0,5 ng/mL, cubriendo el rango de trabajo establecido, con una réplica por cada concentración.

Se utilizó como control positivo un IFA de IFN alfa 2b hu-rec proveniente de un lote productivo y se determinó el valor de concentración de esta muestra, el rango de trabajo como la $\bar{X} \pm 2 \text{ DE}$ y el coeficiente de variación (CV), a partir de los valores promedios de concentración obtenidos en 25 determinaciones interensayo.

Establecimiento del método

El ensayo fue adecuado en el Laboratorio de Inmunoquímica de la Dirección de Control de la Calidad para la cuantificación del IFN alfa 2b hu-rec en muestras de IFA, y consiste en un ELISA tipo "Sandwich" que utiliza dos anticuerpos monoclonales, cada uno de los cuales reconoce a la molécula por sitios diferentes. El IFN alfa contenido en la muestra es capturado en un primer tiempo por el AcM CB-IFN 2.3 acoplado a la fase sólida, y el segundo anticuerpo conjugado a la enzima peroxidasa (AcM CB-IFN 2.4) reconoce al IFN alfa en un segundo tiempo, permitiéndole adquirir la capacidad de transformar un sustrato específico que es un indicador de la concentración analítica original de la muestra. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de moléculas de IFN alfa presentes en la muestra.

Las placas de microtitulación de 96 pocillos (MaxiSorp, Nunc) se recubrieron a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$), con el AcM CB - IFN 2.3 diluido en tampón de recubrimiento (carbonato-bicarbonato de sodio 0,1M, pH 9,6) y se incubaron a 37 °C durante 3 h. Los pocillos se lavaron dos veces con solución de Tween-20 al 0,05% (Merck). Las muestras, el MR y el control positivo se aplicaron (100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$) diluidos en tampón del ensayo (leche descremada (Oxoid) al 0,5% en Solución Salina Tamponada con Fosfatos (SSTF) 1X (KH_2PO_4 0,168 mM; Na_2HPO_4 8,45 mM; KCl 2,61 mM y NaCl 0,137 mM, pH 7,2). Después de incubar las placas durante 30 min a 37 °C, se realizaron cinco lavados con la solución de Tween-20 al 0,05%.

Se adicionó el AcM conjugado (CB-IFN 2.4-PRP) diluido 1:80000 en el tampón del ensayo y se dejó reaccionar durante 40 min a 37 °C, protegiendo las placas de la luz. Después de ocho lavados, la reacción fue revelada con 100 μL por pozo de Ortofenilendiamina (OPD) (Merck) al 0,04% como sustrato, y en tampón citrato (pH 5,5) con 0,04% de peróxido de hidrógeno. La reacción transcurrió en la oscuridad entre 10 y 20 min y se detuvo añadiendo 50 μL por pocillo de una solución de H_2SO_4 2M (Merck). La lectura de las absorbancias se realizó a 492 nm en un lector de microplacas (SUMA, PR-621, Centro de Inmunoensayo).

Para el procesamiento de los resultados se empleó una hoja de cálculo en Excel. Se determinaron los valores de concentración de cada punto de la curva de calibración a partir de las absorbancias obtenidas y se obtuvo un ajuste cuadrático a partir de la ecuación $y = a + bx + cx^2$. La concentración de las muestras y del control positivo se calculó a partir de los valores de absorbancias obtenidos.

Los resultados del programa se expresan en ng/mL, y se promedian los valores de concentraciones obtenidos cuyas absorbancias se encuentren dentro del rango de la curva de calibración, y que su CV intraensayo sea inferior al 10%.

Validación

La validación del ELISA se realizó siguiendo lo planteado en la Regulación No. 41-2007 del CECMED (4), y la ICH Q2 (R1) (5), definiéndose los parámetros a estudiar de acuerdo con la clasificación a que pertenece el método: "Métodos de contenido o potencia".

La linealidad se estudió relacionando las respuestas (absorbancias) con la concentración del analito. Se determinó la ecuación del mejor ajuste, y el coeficiente de determinación de la regresión (R^2), el que debe ser $\geq 0,98$. Se utilizó una hoja de cálculo en Excel, empleando el modelo $y = a + bx + cx^2$ y el método de los mínimos cuadrados.

La especificidad del ensayo se estudió evaluando si éste era capaz de discriminar la presencia del IFN alfa 2b hu-rec en una matriz resultante del mismo proceso de producción pero sin la presencia de dicha proteína, al comparar con el punto de la curva de calibración del ensayo correspondiente a la menor concentración de IFN alfa 2b hu-rec. Se aplicó una prueba "t de Student" de muestras pareadas ($p < 0,05$). En el estudio de la exactitud se empleó el método de recuperación, mediante la adición de concentraciones conocidas (0,5; 3 y 10 ng/mL) de IFN alfa 2b hu-rec, al tampón del ensayo, así como al tampón empleado durante el proceso de purificación del IFA (KH_2PO_4 0,168 mM; Na_2HPO_4 8,45 mM; KCl 2,61 mM y NaCl 0,137 mM, pH 7.2). Se evaluó el porcentaje de recuperación para cada concentración, el cual debe encontrarse entre 80 y 120%.

Para establecer el rango, se estudiaron los resultados obtenidos de las dos concentraciones extremas de la curva de calibración (0,5 y 10 ng/mL) en 10 ensayos. Se determinó el intervalo de confianza para los porcentajes de recuperación obtenidos para la concentración esperada y observada, para comprobar que el 100% de recuperación estuviese incluido dentro del intervalo de confianza calculado.

Se determinó el CV entre los diferentes porcentajes de recuperación obtenidos, considerándose adecuados CV inferiores al 20%.

La precisión se evaluó mediante la repetibilidad y la precisión intermedia, tanto para la curva patrón de IFN alfa 2b hu-rec como para diferentes muestras de IFA de IFN alfa 2b hu-rec, empleadas como control positivo del ensayo.

La repetibilidad para la curva patrón se estudió con 5 curvas patrones de forma independiente en un mismo ensayo, tomándose los datos experimentales del estudio de linealidad, y la precisión intermedia se estudió en 3 ensayos,

evaluándose el comportamiento de las absorbancias para cada concentración.

La repetibilidad para las muestras se estudió mediante la medición de los valores de 15 réplicas de una muestra control en una misma placa por un mismo analista, a las diluciones habituales de trabajo. La precisión intermedia para las muestras (variabilidad interensayo) se estudió con dos muestras evaluadas a diferentes diluciones, con uno y dos analistas en días diferentes.

En todos los casos se determinó la media \bar{X} , la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV), y se consideró que el CV fuese inferior al 10% para el caso de la repetibilidad e inferior al 20% para la precisión intermedia.

El parámetro de robustez se estudió evaluando el efecto borde en las placas de ELISA y la estabilidad de las soluciones empleadas. Se evaluó una muestra control positivo colocada en diferentes posiciones de la placa de ELISA y se determinó si el valor de las densidades ópticas de la muestra colocada en la posición de los bordes estuviese dentro del intervalo de la $\bar{X} \pm 2$ DE, calculado para la muestra ubicada en la posición central de la placa.

El estudio de la estabilidad de las soluciones y su influencia en la robustez del ensayo se realizó mediante los resultados de la precisión intermedia, donde dos analistas utilizaron diferentes lotes de soluciones recién preparadas, con días de preparadas y cercanas a su fecha de vencimiento (6).

Resultados

Establecimiento del método

Los criterios de validez para el ELISA son los siguientes:

- DO del fondo = 0,1.
- Concentración del control positivo del ensayo: dentro del rango de trabajo calculado, y el CV intraensayo inferior al 10%.
- Coeficiente de determinación de la regresión ($R^2 \geq 0,98$).

Validación

Los resultados obtenidos del análisis de la regresión de las curvas patrones demostraron la linealidad en el rango analizado, como se observa en la Figura 1, ya que se obtuvo una buena correlación entre la cantidad teórica y la medida del IFN alfa 2b hu-rec. Los datos obtenidos se ajustaron a una regresión cuadrática, y el coeficiente de determinación de la regresión fue superior a 0,98 ($R^2=0,9993$), siendo estos resultados similares a los reportados por otros autores (7-9).

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos del estudio de especificidad, donde se corrobora que la matriz no interfiere en la cuantificación del principio activo, lo que demuestra la especificidad del ensayo, ya que el mismo es

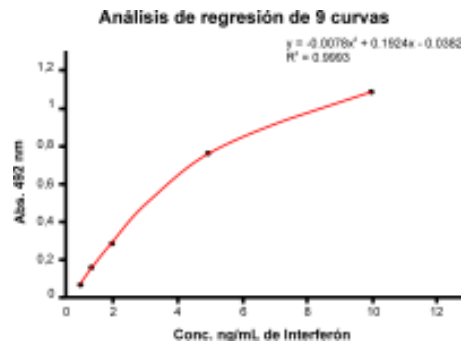


Figura 1. Comportamiento de la linealidad como resultado del análisis de 9 curvas.

Valores del promedio de las concentraciones de 9 curvas de calibración de IFN alfa 2b hu-rec (10, 5, 2, 1 y 0,5 ng/mL) (eje x); contra valores de densidad óptica (DO) a 492 nm (eje y).

Tabla 1. Especificidad del ELISA para la cuantificación del IFN alfa 2b hu-rec.

Ensayo	n	Muestras	Absorbancia promedio a 492 nm	Promedio
1	16	Muestra 1	0,015	p = 2,174E-09
		0,5 ng/mL	0,052	
2	8	Muestra 2	0,014	p = 0,000127
		0,5 ng/mL	0,044	

Muestra 1 y 2: Controles negativos; 0,5 ng/mL: Menor punto de la curva patrón con el que se compararon los resultados.

Tabla 2. Porcentajes de recuperación obtenidos con diferentes tampones.

Tampones	Concentración de IFN alfa (ng/mL)	Media Recuperación (%)
TE	0,5	94,7
	3	100,3
	10	102,4
SSTF	0,5	84,3
	3	96,2
	10	101,8

SSTF: Solución Salina Tamponada con Fosfatos
TE: Tampón del ensayo; media de la recuperación: Promedio de 3 determinaciones independientes para cada concentración.

capaz de discriminar entre el analito y los componentes de la matriz seleccionada, al no existir interferencias de estos componentes en la cuantificación del IFN alfa 2b hu-rec.

En el estudio de exactitud se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 80% y 120% para todas las concentraciones ensayadas, en los dos tampones estudiados. Los valores promedios de recuperación se encontraron en el

rango de 84,3% a 102,4% (Tabla 2), demostrándose la exactitud del método.

Este experimento confirma los resultados obtenidos en el estudio de la especificidad, ya que se demuestra la capacidad del método de evaluar con exactitud el analito en presencia de diferentes tampones, sin interferencias de los mismos.

Los resultados obtenidos de la precisión y la exactitud en el estudio del rango para la concentración superior (10 ng/mL) se presentan en la Tabla 3, demostrándose una buena precisión y exactitud, ya que los CV fueron inferiores al 20% y los porcentajes de recuperación se encontraron entre 80% y 120%, respectivamente. La exactitud obtenida para la concentración inferior (0,5 ng/mL) no se consideró aceptable, ya que el 100% no estuvo incluido en el intervalo de confianza calculado, aunque se obtuvo una buena precisión para esta concentración. Por este motivo se incluyó la concentración de 1 ng/mL en el estudio del rango, y para la misma se obtuvo una buena exactitud y precisión según los resultados obtenidos para la \bar{X} y el CV respectivamente (Tabla 3).

Los resultados de la precisión para la curva patrón y las muestras se presentan en la Tabla 4, se observa en el estudio de la repetibilidad que se obtuvieron CV inferiores al 10%, cumpliendo con el criterio de aceptación para este parámetro. En el caso de la precisión intermedia se obtuvieron CV inferiores al 20%, que fue el criterio de aceptación establecido.

En el estudio de precisión intermedia se demuestra, además, que el factor analista no contribuye a la variabilidad del ensayo, coincidiendo con lo reportado por Welfringer et al (10), y es de destacar que los CV obtenidos para este parámetro se encontraron incluso por debajo del 10%, que es el criterio para la repetibilidad, lo que confirma el desempeño satisfactorio del ensayo en cuanto a la variabilidad. Con respecto a la robustez del ensayo mediante el estudio del efecto borde en las placas de ELISA, se presentan los resultados obtenidos para las dos variantes estudiadas (centro y bordes) en la Tabla 5.

Tabla 3. Exactitud y Precisión de las concentraciones extremas de la curva de calibración.

Concentración de IFN alfa (ng/mL)	Media (%)	Intervalo (%)	CV (%)
10	100,0	97,3 - 102,7	3,8
1	98,4	94,0 - 102,8	6,2

Media: Porcentaje de recuperación para las concentraciones esperada y observada
Intervalo: Intervalo de confianza para los porcentajes de recuperación obtenidos
CV: Coeficiente de Variación

Tabla 4. Repetibilidad y precisión intermedia del ELISA.

	Parámetro	CV (%)
Curva patrón	Repetibilidad	2,4 - 9,6
	Precisión intermedia	2,8 - 11,5
Muestra control	Repetibilidad	7,5 - 8,7
	Precisión intermedia (1 analista)	6,9 - 8,6
	Precisión intermedia (2 analistas)	6,2 - 9,1

CV: Coeficiente de variación

Tabla 5. Concentraciones del control positivo ubicado en el centro y bordes de la placa.

	Centro	Bordes
	\bar{X} (µg/mL)	\bar{X} (µg/mL)
	308,84	324,30
	265,80	303,66
	318,71	271,61
	283,72	264,38
	298,40	261,09
		328,05
		305,62
		285,07
		304,89
Intervalo (µg/mL)	242,18 - 339,15	

\bar{X} : Concentraciones promedio de las dos diluciones realizadas del control positivo en cada una de las posiciones correspondientes a las muestras, en el centro y bordes de la placa.

Intervalo: $\bar{X} \pm 2$ DE calculado para las concentraciones de la posición central.

Tabla 6. Soluciones estudiadas para la robustez.

Solución	Fecha de vencimiento	Temperatura de conservación
Tampón de recubrimiento	30 días	De 2 a 8 °C
SSTF 1X	30 días	Temperatura ambiente
Tampón sustrato	6 meses	-20 °C
Solución de parada	6 meses	Temperatura ambiente

Para la muestra colocada en los bordes de la placa, los valores promedios de concentraciones se encuentran dentro del intervalo calculado a partir de los valores de las concentraciones de la muestra colocada en la posición del centro de la placa.

Se demuestra que no existe efecto borde, ya que no hay diferencias entre las dos variantes estudiadas (centro y bordes), por tanto, se puede concluir que la determinación del IFN alfa 2b hu-rec no se afecta por la ubicación de la muestra en diferentes posiciones de la placa, por efecto de la temperatura. Los resultados del estudio de la estabilidad de las soluciones empleados se presentan en la Tabla 6.

Estas soluciones se emplearon en los ensayos en diferentes momentos de su período de validez: desde el momento de su preparación hasta que se encontraban cercanas a su fecha de vencimiento, en ensayos diferentes realizados por dos analistas que utilizaron diferentes lotes de estas soluciones.

La variabilidad interensayo obtenida fue inferior al 20%, cumpliendo con los criterios de validez para este parámetro, por lo que se confirma la robustez del ensayo con relación a la estabilidad de las soluciones.

Discusión

Este método es comparable con otros ELISAs reportados en la literatura para la cuantificación de interferones como principio activo (11, 12), destacándose entre sus ventajas las siguientes: sensibilidad hasta 0,5 ng/mL (aunque el rango se estableció a partir de 1 ng/mL), pueden analizarse en un ensayo entre 8 y 10 muestras diferentes además del control positivo, el tiempo del ensayo es corto, tiene un bajo costo, y su manipulación es relativamente fácil para un personal adiestrado en técnicas de laboratorio.

Está descrito en algunas guías (5) que para demostrar la linealidad en algunos procedimientos analíticos, en ocasiones hay que aplicar una transformación matemática a los datos, ya que la respuesta analítica debe medirse mediante una función adecuada de la concentración del analito en la muestra, y que después de la transformación de los datos entonces se puede demostrar la linealidad para el rango de trabajo que se defina.

En otros procedimientos analíticos, como los inmunoensayos, no es posible alcanzar la linealidad aplicando una transformación. En estos casos la respuesta analítica se describe por una función apropiada de la concentración (cantidad de analito en la muestra), y la prueba de linealidad se convierte en una prueba de la calidad del ajuste de esta función a los datos experimentales (13, 14).

En nuestro caso el parámetro evaluado es el coeficiente de determinación de la regresión (R^2), que debe ser $\geq 0,98$, el

mismo valor que se considera adecuado para las regresiones lineales.

El establecimiento del rango de trabajo entre el mayor y el menor valor de concentración, determinando la exactitud y la precisión para estas dos concentraciones, ha sido reportado por otros autores, como Leyva y cols. (15).

Para el establecimiento del rango pueden ser considerados los resultados del estudio de linealidad (5), lo que está relacionado con el uso previsto para el método analítico. Los resultados del estudio de linealidad del ensayo corroboran que el rango de 1 a 10 ng/mL es adecuado, ya que los porcentajes de recuperación se encontraron entre 80% y 120%.

Otros autores han empleado similares criterios de aceptación en el estudio de la exactitud de un ensayo ELISA, y han obtenido resultados comparables a los referidos en este trabajo (15 -19).

Los resultados obtenidos en el estudio de precisión son similares a los reportados en la literatura por otros investigadores; en el caso de Bouyón y cols. para un ELISA de Interferón Gamma humano recombinante se reportan CV inferiores al 15%, resultando la precisión del ensayo adecuada para permitir la comparación directa de muestras ensayadas tanto en la misma placa como en diferentes placas, y en días diferentes (12, 15, 18-21).

Los métodos basados en la unión de ligandos (LBA, del inglés Ligand Binding Assay), como es el caso de los inmunoensayos (con la interacción entre moléculas biológicas), presentan un grado elevado de complejidad, debido a las particularidades de la curva de calibración (curva patrón), la variabilidad y estabilidad de los reactivos biológicos, los posibles efectos de la matriz donde se encuentran los controles y las muestras, y las diluciones requeridas, además de los factores que pueden afectar las diferentes uniones en las que se basa el ensayo, donde participa el soporte empleado (22-25).

Se han efectuado talleres e intercambios internacionales con el fin de lograr un consenso en relación con la validación de estos métodos, pero a pesar de lograr un cierto nivel de armonización, todavía quedan tópicos controvertidos, por lo tanto, al validar un inmunoensayo, se deben tener en cuenta las recomendaciones de las guías y las regulaciones vigentes, pero a la vez considerar las particularidades y fines del método específico.

Hay autores, como Kanarek (26), que precisan varios aspectos que deben tenerse en cuenta para la validación de estos métodos, en particular los que utilizan microplacas y multipipetas (como es nuestro caso) y realzan la importancia de la validación de estos métodos cuando se emplean para

controlar la calidad en procesos de producción de biofarmacéuticos.

Podemos concluir que se estableció y validó un ensayo tipo ELISA de doble anticuerpo para la cuantificación del IFN alfa 2b hu-rec en el IFA, cumpliendo con los criterios de aceptación todos los parámetros de calidad evaluados en la validación del método analítico.

Se demostró que el método cumple con los requisitos para ser empleado en el Control de la Calidad del IFN alfa 2b hu-rec en el IFA producido en el CIGB.

Referencias

1. Reina M. Métodos en Biología Celular. ELISA. Tema 1: Anticuerpos y su producción, 2003. Disponible en: www.ub.es/biodel/wbc/tecnicas/elisa.htm.
2. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Regulación No. 37-2004: Buenas Prácticas de Laboratorio para el Control de Medicamentos. La Habana, Cuba, 2004.
3. PPO 4.09.036.91: Procedimiento para la identificación y/o cuantificación del alfa Interferón por un ELISA tipo Sandwich. Edición 06, CIGB, 2008.
4. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Regulación No. 41-2007: Validación de Métodos Analíticos. La Habana, Cuba, 2007.
5. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, 2005.
6. Díaz M, Hernández I, Martínez M, Tornés MV, Gómez L, Louro G, et al. Validación de técnicas analíticas utilizadas en el control de la calidad. *Revista Cubana de Farmacia* 1998; 32 (2):106-12.
7. Wan M, Wang Y, Rabideau S, Moreadith R, Schrimsher J, Conn G. An enzyme-linked immunosorbent assay for host cell protein contaminants in recombinant PEGylated staphylokinase mutant SY161. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002;28 :953-63.
8. Fajardo EM, Delgado I, Riverón L, Izquierdo L, Iglesias N, Álvarez E, et al. Validación de un ELISA tipo inhibición para cuantificar polisacárido Vi en la vacuna antitifoídica cubana vax-TyVi. *VacchiMonitor* 2006;15(2): 5-12.
9. Güll I, Wirth M, Gabor F. Development of a sensitive and reliable ELISA for quantification of wheat germ agglutinin. *Journal of Immunological Methods* 2007;318:20-9.
10. Welfringer F, d' Athis P, Scherrmann JM, Hervé F. Development and validation of an antigen-binding capture ELISA for native and putrescine-modified anti-tetanus F(ab')₂ fragments for the assessment of the cellular uptake and plasma kinetics of the antibodies. *Journal of Immunological Methods* 2005;307:82-95.
11. Santana H, Espino Y, Franco A, Furrázola G, Hardy E. A sandwich-type enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of recombinant human interferon α -2b. *Biotechnology Techniques* 1999;13:341-6.
12. Bouyón R, Santana H, Pérez EM, Hernández N, Furrázola G, Abrahantes MC. Development and Validation of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Recombinant Human Gamma Interferon. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* 2003;24(1):1-10.
13. Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, García AM, Estrada E, Blanco R, Sotolongo F. Principios y procedimientos para la validación de inmunoensayos cuantitativos empleados para evaluar la inmunogenicidad de vacunas. *VacchiMonitor* 1999;8 (10):9-13.
14. Shah VP. The History of Bioanalytical Method Validation and Regulation: Evolution of a Guidance Document on Bioanalytical Methods Validation. *The AAPS Journal* 2007;9 (1):E43-7.
15. Leyva A, Franco A, González T, Sánchez JC, López I, Geada D, et al. A rapid and sensitive ELISA to quantify an HBsAg specific monoclonal antibody and a plant-derived antibody during their downstream purification process. *Biologicals* 2007; 35:19-25.
16. Raux M, Finkielstejn L, Salmon-Ceron D, Bouchez H, Excler JL, Dulioust E, et al. Development and standardization of methods to evaluate the antibody response to an HIV-1 candidate vaccine in secretions and sera of seronegative vaccine recipients. *Journal of Immunological Methods* 1999; 222:111-24.
17. Maple L, Lathrop R, Bozich S, Harman W, Tacey R, Kelley M, et al. Development and validation of ELISA for Herceptin detection in human serum. *Journal of Immunological Methods* 2004;295:169-82.
18. Martínez M, Currás T, Pérez E, Acosta A, Rojas I, Almazán M, et al. Control analítico y especificaciones de calidad del Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante usado como materia prima activa en formulaciones farmacéuticas. *Biotecnología Aplicada* 1994;11 (1):78-82.
19. Nirmala C, Trivedi R, Venkata P, Mullangi R, Srinivas NR. Development and validation of a sensitive ELISA for quantitation of Grastim® (rhG-CSF) in rat plasma: application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography* 2006; 20::945-950.
20. Karnaukhova E, Golding B, Ophir Y. Development and evaluation of an ELISA for quantification of human alpha-1-proteinase inhibitor in complex biological mixtures. *Biologicals* 2007; 35:285-295.
21. Hansen S, Schmidt V, Steffensen MA, Jensen PH, Gjerstorff M, Thiel S, Holmskov U. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantification of mouse surfactant protein D (SP-D). *Journal of Immunological Methods* 2007; "En prensa". Disponible en: www.elsevier.com/locate/jim.
22. Findlay JWA, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, DeSilva BS, et al. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2000;21: 1249-73.
23. Hill H. Towards a consensus on validation of bioanalysis methods for large molecules. *Meetings. The Pharmaceutical Journal* 2004;272:360-61.

24. Bansal S, DeStefano A. Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Small Molecules. The AAPS Journal 2007;9 (1):E109-14.
25. Kelley M, DeSilva B. Key Elements of Bioanalytical Method Validation for Macromolecules. The AAPS Journal 2007; 9 (2):E156-63.
26. Kanarek AD. Method Validation Guidelines. BioPharm International 2005. Supplement, p. 28-33 [Disponibile en: <http://biopharminternational.findpharma.com/biopharm/Analytical+Methods+Articles/Method-Validation-Guidelines/ArticleStandard/Article/detail/185606>].

Establishment and validation of an ELISA-type immunoenzymatic assay, used for quality control of human recombinant alpha-2b Interferon

Abstract

An ELISA for quantification of human recombinant alpha-2b Interferon in the Active Pharmaceutical Ingredient (API) was established and validated, and the validity criteria for the assay were defined, based on Good Laboratory Practices compliance. The following parameters were evaluated: linearity, specificity, accuracy, range, precision and robustness. The assay was specific, with accuracy from 84.3 to 102.4%, a quadratic adjustment and a working range from 1 to 10 ng/mL, repetibility and intermediate precision with coefficients of variation lower than 10% and 20% respectively, and robustness confirmed in relation to the edge effect and the stability of solutions.

Keywords: ELISA, human recombinant alpha-2b Interferon, validation.

Recibido: Noviembre de 2008

Aceptado: Enero de 2009