

Optimización de un ELISA indirecto para evaluar la inmunogenicidad no deseada del Heberprot-P®

Optimization of an indirect ELISA to assess the unwanted immunogenicity of Heberprot-P®

Carlos Alberto Hernández^{1*} <https://orcid.org/0000-0003-4839-884x>

Maylin Pérez-Bernal¹ <https://orcid.org/0000-0002-3769-4857>

Magali Delgado¹ <https://orcid.org/0000-0002-3997-1256>

Enrique Pérez¹ <https://orcid.org/0000-0002-6385-1692>

José Manuel Sánchez¹ <https://orcid.org/0009-0002-5269-3796>

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Sancti Spiritus, Cuba.

Autor para correspondencia: carlos.hernandez@cigb.edu.cu

RESUMEN

Introducción: A pesar de su amplio uso en la práctica clínica, la inmunogenicidad de Heberprot-P® y su influencia sobre la eficacia y seguridad de este fármaco se desconoce. Para obtener esta información se necesita optimizar un inmunoensayo que detecte niveles fisiológicamente relevantes de anticuerpos específicos.

Objetivo: Optimizar, mediante un diseño factorial completo, paso a paso, un ELISA indirecto semicuantitativo, para evaluar la inmunogenicidad no deseada contra el Heberprot-P® en suero de pacientes tratados.

Métodos: A partir de un ELISA inicial, se evaluaron diferentes factores y niveles, mediante diseños factoriales completos, en cuatro pasos del ensayo: recubrimiento de la placa, unión antígeno-anticuerpo, anticuerpo-conjugado y enzima-sustrato. La mejor combinación de factores y niveles en un paso se incorporó para optimizar el siguiente. El diseño experimental concibió un procesamiento estadístico simple.

Resultados: El ELISA optimizado demostró la especificidad del ensayo y logró una detectabilidad de anticuerpos 17 veces superior al inicial.

Conclusiones: La optimización paso a paso del ELISA, mediante un diseño factorial completo, y la incorporación sucesiva al protocolo de la mejor combinación de factores y niveles, permite obtener un inmunoensayo específico y de mayor detectabilidad de anticuerpos específicos. El diseño experimental vinculado a un procesamiento estadístico simple facilita la interpretación de los resultados, sobre todo en aquellos laboratorios donde no existe asesoramiento estadístico capacitado.

Palabras clave: diseño factorial completo; ELISA; Heberprot-P®; optimización.

ABSTRACT

Introduction: Despite its wide use in clinical practice, the immunogenicity of Heberprot-P® and its influence on the efficacy and safety of this drug is unknown. To obtain this information, an immunoassay that detects physiologically relevant levels of specific antibodies needs to be optimized.

Objective: To optimize, by means of a complete factorial design, step by step, a semi-quantitative indirect ELISA, to evaluate the undesired immunogenicity against Heberprot-P® in serum of treated patients.

Method: From an initial ELISA, different factors and levels were evaluated, using complete factorial designs, in four steps of the assay: plate coating, binding of antigen-antibody, antibody-conjugate, and enzyme-substrate. The best combination of factors and levels in a step was incorporated to optimize the next one. The experimental design conceived a simple statistical processing.

Results: The optimized ELISA demonstrated the specificity of the assay and achieved antibody detectability 17 times higher than the initial one.

Conclusions: The step-by-step optimization of the ELISA, through a complete factorial design, and the successive incorporation into the protocol of the best combination of factors and levels, allows obtaining a specific immunoassay with greater detectability of specific antibodies. The experimental design linked to a simple statistical processing

facilitates the interpretation of the results, especially in those laboratories where there is no qualified statistical advice.

Keywords: ELISA; full factorial design; Heberprot-P®; optimization.

Recibido: 22/06/2023

Aprobado: 29/04/2024

Introducción

Ha sido incuestionable el impacto positivo de los biofarmacéuticos en numerosas enfermedades, pero la naturaleza misma de estas macromoléculas tiene un inconveniente importante: pueden ser inmunogénicos en humanos. Esta respuesta inmunológica no deseada a las proteínas terapéuticas tiene potencialidad para afectar su eficacia, seguridad, farmacodinamia y farmacocinética. Los efectos clínicos de estas respuestas inmunitarias en los pacientes van desde no medibles, clínicamente benignos, a extremadamente dañinos. ⁽¹⁾

Aunque ambas ramas, humoral y celular, de la respuesta inmune pueden ser activadas por estos medicamentos, la presencia de anticuerpos antidrogas (AAD) ha sido motivo de especial preocupación. Tomando este potencial riesgo en consideración, las agencias reguladoras solicitan que la inmunogenicidad debe evaluarse como parte del proceso de aprobación de las proteínas terapéuticas. ⁽¹⁾ Con respecto a la detección de los AAD, las agencias reguladoras han desarrollado declaraciones y directrices para asesorar sobre los métodos adecuados y el tipo de ensayos para la evaluación de la inmunogenicidad no deseada, destacando la medición y caracterización de anticuerpos. ⁽²⁾

EL Heberprot-P® es una formulación liofilizada que contiene el factor de crecimiento epidérmico humano recombinante (rhEGF, por sus siglas en inglés), como ingrediente activo. Esta proteína terapéutica ha sido aprobada en Cuba para el tratamiento de las

úlceras del pie diabético (UPD). El ensayo clínico aleatorizado, en el que se basó su aprobación, mostró que la inyección intralesional del Heberprot-P® aumenta la granulación y cicatrización en la UPD avanzada.⁽³⁾ Miles de pacientes han sido tratados con Heberprot-P® con efectos terapéuticos positivos y un perfil de seguridad favorable. Un meta análisis reciente, sobre el uso de los rhEGFs (incluyendo el Heberprot-P®) para el tratamiento de la UPD, concluyó que “la evidencia disponible apoya el uso de los rhEGFs para facilitar la curación de la UPD.”⁽⁴⁾

A pesar de su amplio uso en la práctica clínica, la inmunogenicidad de Heberprot-P® y su influencia sobre la eficacia, farmacocinética y seguridad de este fármaco se desconoce. Para obtener esta información se necesita optimizar y validar un inmunoensayo que permita detectar niveles fisiológicamente relevantes de anticuerpos específicos. Aunque el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, de sus siglas en Inglés) es un ensayo de unión a ligandos potencialmente robusto y sensible, su desarrollo y optimización pueden ser un desafío. Dado que el método implica el ensamblaje de un complejo inmunitario grande con varios componentes, la señal del ensayo puede verse afectada por muchos factores. Se deben considerar varios parámetros durante el proceso de optimización, como la inmovilización inicial de la biomolécula en la superficie sólida, los tampones utilizados en el ensayo, el tiempo y la temperatura de incubación, según el sistema de detección utilizado.⁽⁵⁾ La optimización persigue aumentar la sensibilidad y la robustez del ELISA.^(6,7)

La identificación de las variables clave del ensayo se ha realizado durante mucho tiempo siguiendo el método de un factor a la vez (OFAT, de sus siglas en inglés). En este modelo, la optimización de muchas variables o factores que condicionan el ensayo se realiza estudiando cada factor de forma independiente, manteniendo todos los demás constantes, lo que muchas veces conduce a resultados incompletos porque no explora ni determina interacciones importantes entre los factores.⁽⁸⁾ Como alternativa a OFAT, el diseño de experimentos factoriales es un enfoque sistemático y basado en estadísticas para evaluar combinaciones de factores y ajustar parámetros para optimizar los resultados del ensayo.⁽⁹⁾ En este método, múltiples factores experimentales se varían simultáneamente y, a diferencia de OFAT, los efectos

individuales e interactivos se pueden interpretar con precisión, realizando menos experimentos en menos tiempo que el que requeriría el enfoque OFAT. ⁽¹⁰⁾

En 2009, Ray *et al.* afirmaron que a pesar de sus ventajas y resultados confiables, los experimentos factoriales se habían utilizado con poca frecuencia para optimizar los inmunoensayos. ⁽¹¹⁾ Es una deficiencia que persiste hasta el día de hoy. Dado que el ELISA es un procedimiento de múltiples pasos, es conveniente aplicar diseños factoriales completos que incluyan sucesivamente cada uno de los factores y niveles que intervienen en estos pasos, como se describe en el procedimiento desarrollado en nuestro laboratorio y recientemente publicado. ⁽¹²⁾ El objetivo de este trabajo fue optimizar, mediante un diseño factorial completo, paso a paso, un ELISA indirecto semicuantitativo, para evaluar la inmunogenicidad no deseada contra el Heberprot-P® en los pacientes tratados.

Métodos

Reactivos biológicos

Para preparar el control de calidad negativo fue utilizado una mezcla de sueros de 20 pacientes diabéticos con UPD, antes del tratamiento con Heberprot-P®, donados por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB, La Habana, Cuba). El control de calidad positivo se preparó a partir de una mezcla de sueros de tres pacientes tratados con la vacuna CimaVax-EGF, donados por el Centro de Inmunología Molecular (La Habana, Cuba), ⁽¹³⁾ con una concentración de 162,4 µg/mL de anticuerpos anti-EGF. A partir de esta mezcla de sueros positivos, se prepararon dos muestras: una con alta concentración de anticuerpos anti-EGF (CPA, a 3000 ng/mL) y otra con baja concentración (CPB, a 94 ng/mL). Como diluyente de ambas muestras se utilizó una mezcla de sueros de donantes de sangre, donados por el Banco Provincial de Sangre (Sancti-Spíritus, Cuba). El ingrediente farmacéutico del Heberprot-P® fue donado por el CIGB y utilizado como antígeno del ELISA. Se utilizó como conjugado un anti-inmunoglobulinas humanas (IgA, IgG e IgM)- fosfatasa alcalina (Sigma). Todos los

reactivos fueron almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso, excepto el conjugado que se guardó a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Protocolo del ELISA indirecto inicial

El ELISA indirecto inicial, diseñado en nuestro laboratorio, se obtuvo por el método OFAT. Este procedimiento se describe a continuación y se utilizó como referencia para comparar la eficacia del ELISA optimizado a través de una secuencia de experimentos factoriales completos en los pasos del ensayo:

a) Las placas de microtitulación de 96 pocillos (Thermo Scientific™ Nunc™ Polysorp) en formato de tiras, se recubrieron con $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ de antígeno (rhEGF, CIGB, Cuba) aplicados en $100\text{ }\mu\text{l/pocillo}$ de tampón de recubrimiento (solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2) y se incubó 1 h a 37°C .

b) Se lavó la placa cuatro veces con $380\text{ }\mu\text{l/pocillo}$ de tampón de lavado (TL) diluido 1:25 (TL 25X: 0,292 M Tris-hidroximetil-aminometano, HCl 0,228 M, NaCl 3,75 M y 1,25% Tween-20).

c) Los pocillos se bloquearon con $380\text{ }\mu\text{L}$ de una solución de bloqueo (SB: Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; NaCl 1,0 M y albúmina de suero bovino al 1%) durante 90 min a 37°C .

d) Después de un lavado, como en b), se aplicaron $100\text{ }\mu\text{l/pocillo}$ de muestras de suero y controles de calidad (por duplicado), diluidos 1:100 con tampón de dilución (TD: 50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1,0 M NaCl, 1% albúmina de suero bovino y Tween-20 al 1%) y se incubó la placa 1h a 37°C .

e) Como el paso b)

f) Se aplicó $100\text{ }\mu\text{L/pocillo}$ del conjugado anti-inmunoglobulinas humanas-fosfatasa alcalina, diluido 1:12000 en TD. La placa se incubó 1h a 37°C .

g) Como el paso b)

h) Las placas se incubaron 1h en la oscuridad a $(22-25)^{\circ}\text{C}$ con $100\text{ }\mu\text{L/pocillo}$ de fosfato de p-nitrofenilo ($1,0\text{ mg/ml}$, en dietanolamina 1,0 M, MgCl_2 0,5 mM, pH 9,8).

i) El desarrollo del color fue terminado añadiendo $100\text{ }\mu\text{l/pocillo}$ de EDTA disódico 0,1 M. La absorbancia se midió a 405 nm ($A_{405\text{nm}}$) en un lector de placas ELISA (PR-621, Tecnosuma Internacional, La Habana, Cuba). Se usó el TD como blanco de ensayo.

Optimización del protocolo inicial para el ELISA

Para la optimización de cada paso de este ELISA, mediante experimentos factoriales completos, se utilizaron dos concentraciones de anticuerpos anti-rhEGF (control positivo): alta concentración (CPA a 30 ng/mL) y baja concentración (CPB a 0,94 ng/mL). Los factores y niveles optimizados en un paso de ELISA se incorporaron al protocolo para optimizar el próximo paso correspondiente.

Recubrimiento de la placa

Los efectos de los parámetros de recubrimiento se analizaron utilizando un diseño factorial completo de 3x2x2x2:

- Concentración de rhEGF: 2; 6 y 10 µg/mL
- Tampón de recubrimiento: Tampón de carbonato-bicarbonato (50 mM, pH 9,6) y PBS, pH 7,2.
- Temperatura de incubación: Temperatura de laboratorio (TA), de (22-25)°C y 37°C.
- Tiempo de incubación: 2h y 3h

Se revistieron cuatro placas Polysorp de Nunc™ en formato de tiras. La mitad de cada una se recubrió con rhEGF en PBS y la otra mitad con rhEGF en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6. En cada mitad se utilizaron dos columnas o tiras por concentración de rhEGF. La distribución de las combinaciones temperatura-tiempo por placa se organizó de la siguiente manera: TA-2h; TA-3h; 37°C-2h y 37°C-3h. La señal correspondiente a cada tratamiento (cada par de tiras/placa) se evaluó añadiendo cuatro repeticiones del blanco, el control negativo, el CPB y el CPA.

Unión del antígeno a los anti-rhEGF

Para esta evaluación, las placas fueron recubiertas con las condiciones óptimas obtenidas en 2.3.1. Para optimizar esta etapa se utilizó un diseño factorial completo 3x2x3:

- Tampón de dilución de los anti-rhEGF: 1) 50 mM de tris-HCl, pH 7,4; 1 M de NaCl, 1% (v/v) de tween-20 y 1% (p/v) de albúmina de suero bovino. 2) 50 mM de tris-HCl, pH 7,4;

0,5 M de NaCl, 0,3% (v/v) de tween-20 y 1% (p/v) de albúmina de suero bovino. 3) 50 mM de tris-HCl, pH 7,4; 0,5 M de NaCl, 1% (v/v) de tween-20 y 1% (p/v) de albúmina de suero bovino.

- Temperatura de incubación: TA y 37°C
- Tiempo de incubación: 1h, 2h y 3h

Se utilizaron seis placas, una para cada combinación temperatura-tiempo y se distribuyeron tres secciones por placa, una para cada tampón de dilución. En cada placa se aplicaron por cuadruplicado el control negativo, el CPB, y el CPA. El blanco se añadió al resto de los pozos.

Unión de los anti-rhEGF al conjugado enzimático

Para la optimización de este paso se utilizaron las mejores condiciones obtenidas en los dos pasos anteriores. Se siguió la misma combinación de factores, niveles y réplicas descrita en 2.3.2. El conjugado se aplicó en dilución 1:12000, como en el ELISA inicial. Luego de definir las mejores condiciones para este paso, se realizó un experimento para verificar la dilución óptima del conjugado. Se ensayaron seis diluciones del conjugado: 1:3000, 1:6000, 1:12000, 1:24000, 1:48000 y 1:96000. Para cada dilución, se midió la señal por triplicado del blanco y del CPA. Como dilución óptima se seleccionó la que produjo una mayor relación CPA/blanco.

Reacción de fosfatasa alcalina con el p-nitrofenil fosfato

Para optimizar este paso se aplicaron las condiciones óptimas logradas en las tres etapas anteriores del ELISA. Se utilizó un diseño factorial completo 2x2. Los factores evaluados fueron el tiempo de reacción enzima-sustrato (30 min y 1h) y la temperatura de incubación (TA y 28°C). Para este experimento se utilizaron cuatro placas (una para cada combinación de tiempo y temperatura). A cada placa se le midió por cuadruplicado la señal del blanco, del control negativo, del CPB y del CPA.

Pasos de lavado

Luego de optimizar las cuatro etapas anteriores, se probaron nuevas condiciones de lavado: (3,4 y 6) lavados. El tiempo de lavado se mantuvo en 10 s. Se aplicó el mismo número de lavados por placa después de cada paso del ELISA, excepto después del bloqueo, que se mantuvo con 1 lavado durante 10 s como en el protocolo del ELISA inicial. Se utilizó una placa por cada tratamiento de lavado. En cada placa se destinaron cuatro pocillos para blanco, cuatro para el control negativo y 24 pocillos para el CPB y el CPA, respectivamente. El lavador de placas utilizado fue el modelo MW-2001 PROWASH (Tecnosuma Internacional, La Habana, Cuba) con una presión de dosificación de 3,5 psi, una presión de vacío $\geq 10,06$ psi y un flujo de vacío ≥ 5 L/min en el cabezal de succión.

Especificidad

Este parámetro se evaluó utilizando el ELISA optimizado, con un paso adicional. Este paso consistió en preincubar la mezcla de los anti-rhEGF con el antígeno rhEGF en solución antes de agregarlo a la placa. Los controles positivos fueron inhibidos con 100 μ g/mL del antígeno durante 1 h a (22-25)°C. El control no inhibido contenía PBS en lugar del antígeno. La valoración se realizó usando concentraciones alta (CPA) y una baja (CPB) del control positivo. Las muestras, tanto inhibidas como el control no inhibido, se colocaron en las placas de ELISA utilizando dos variantes: la placa recubierta con el antígeno y bloqueado con SB como se describió antes, y la placa sin recubrimiento pero bloqueada con SB, que fue utilizada para la corrección de la señal de fondo. Cada muestra se colocó por triplicado en la placa. El porcentaje de inhibición (%I) fue calculado de la siguiente manera: $\%I = 100 - 100 \times (A_{405nm} \text{ inhibido}) / (A_{405nm} \text{ no inhibido})$. A_{405nm} , representa la señal de absorbancia a 405 nm de los controles positivos. El ELISA se consideró específico si la media de los porcentajes de inhibición fue cercana al 100 %.

Curvas de titulación del control positivo para evaluar el efecto de la optimización del ELISA

Las curvas se prepararon mediante diluciones seriadas 1:2 a partir de 1/5000 hasta 1/640000 del control positivo, cuando la señal se midió con el ELISA optimizado. Cuando se evaluó la señal con el ELISA inicial (no optimizado factorialmente), el rango de diluciones utilizado fue de 1/300 hasta 1/38400. Ambas curvas se compararon en términos de la detectabilidad (título) alcanzada por el ELISA. Este parámetro se midió interpolando en las curvas de regresión la A405nm, correspondiente a dos veces la media del control negativo. Las curvas se ajustaron mediante regresión logística de cinco parámetros usando el software GraphPad Prism. Ambas curvas fueron repetidas por triplicado durante seis días por dos analistas, tres días cada uno. Para la evaluación de la repetibilidad intracurva, la exactitud del 75% de los puntos de la curva, evaluados por porcentaje de error relativo (%ER), debió ser inferior al 20%, excepto en el punto inferior de la curva, que debió ser inferior al 25%. La precisión y la exactitud intercurvas se evaluaron mediante el coeficiente de variación expresado en porcentaje (%CV) y %ER, respectivamente. Ambos debieron ser inferiores al 15%, excepto en el punto inferior de la curva, que debió ser inferior al 20%.⁽¹⁴⁾ El %ER y el %CV se determinaron mediante las fórmulas:

$$\%ER = (\text{media de la concentración calculada} - \text{concentración nominal}) / \text{concentración nominal} \times 100$$
$$\%CV = (\text{desviación estándar} / \text{media de la concentración calculada}) \times 100$$

Análisis estadístico

El procesamiento de datos se realizó mediante el paquete estadístico SPSS 21.0. La variable dependiente utilizada para seguir la optimización del ELISA fue la relación señal/ruido (S/R), que es la relación entre las señales A405nm de CPB y CPA, corregidas con el blanco de ensayo, y la señal del blanco. El TD de las muestras se utilizó como blanco del ensayo. La mejor combinación de factores para cada paso del ELISA se definió como aquella con el mayor valor de S/R. Las medias de estos valores se obtuvieron de la salida del programa SPSS, siguiendo las opciones del menú: Analizar/Modelo lineal general/Univariado/Estadística descriptiva. En cada paso se determinaron los efectos individuales e interactivos de los factores mediante un ANOVA

factorial completo, donde se evaluó la significación estadística ($\alpha = 0,05$) de los efectos principales de cada factor y la interacción entre factores. Los tamaños del efecto se evaluaron utilizando el estadístico Eta-cuadrado parcial. Para la determinación del número óptimo de lavados se utilizó, con el mismo nivel de significación, un ANOVA unifactorial y la comparación múltiple de medias se hizo con el test HSD de Tukey.

Resultados

Optimización de los pasos de ELISA

Recubrimiento de la placa

En este paso se evaluaron cuatro factores y sus interacciones (Fig.1A). Los factores concentración de rhEGF, tampón, temperatura y tiempo de incubación fueron significativos ($p=0,000$) para ambos niveles de anti-rhEGF. Asimismo, la interacción de primer orden con mayor efecto en la señal del ELISA fue concentración-tampón, seguido de concentración-temperatura y tampón-temperatura. El factor tiempo fue el efecto principal de menor influencia en la señal y forma parte de todas las interacciones de primer y segundo orden no significativas ($p \geq 0,098$). Con ambas concentraciones de antígeno se encontraron interacciones significativas de segundo orden ($p \leq 0,001$) y la interacción entre los cuatro factores también fue significativa ($p \leq 0,021$).

La combinación entre los niveles de los factores que produjo un mayor promedio de S/R, tanto con el CPB ($S/R=4,97 \pm 0,25$) como con el CPA ($S/R=42,4 \pm 1,4$) fue:

- Concentración de rhEGF: 10 $\mu\text{g/mL}$
- Tampón de recubrimiento: PBS
- Temperatura de incubación: TA
- Tiempo de incubación: 1h

Cuando se disolvieron 2 $\mu\text{g/mL}$ de rhEGF en tampón carbonato-bicarbonato, pH 9,6 y se incubó durante 2 h a 37 °C, se obtuvo la S/R mínima para CPB ($S/N= 1,15 \pm 0,10$) y para CPA ($S/R= 6,00 \pm 1,04$).

Unión del antígeno a los anti-rhEGF

Se ensayaron tres factores y sus cuatro interacciones para la optimización de la unión del antígeno, que recubría la placa, a los anticuerpos específicos de los controles positivos (Fig.1B). Tanto los efectos principales de los tres factores como sus interacciones mostraron un efecto significativo en la variabilidad de la señal ($p \leq 0,013$) en las dos concentraciones de anti-rhEGF probadas. La interacción tiempo-tampón se detectó como la más importante, con un efecto superior al efecto principal del factor temperatura, que fue más acentuado con el CPB.

La máxima relación S/R: $13,8 \pm 0,6$ y $63,2 \pm 0,6$ para CPB y CPA, respectivamente, se produjo con la siguiente combinación entre los niveles de los factores:

- Tampón de dilución de los anti-rhEGF: 50 mM de tris-HCl, pH 7,4; 1 M de NaCl, 1% (v/v) de tween-20 y 1% (p/v) de albúmina de suero bovino.
- Temperatura de incubación: TA
- Tiempo de incubación: 2h

La peor relación S/R involucró niveles totalmente diferentes a los que dieron la máxima señal en ambas concentraciones de anti-rhEGF: disolución de los controles positivos en 50 mM de tris-HCl, pH 7,4; 0,5 M de NaCl; 0,3% (v/v) de tween-20 y 1% (p/v) de albúmina de suero bovino e incubación de estos 1h a 37 °C. Con el CPB la relación S/R fue de $1,91 \pm 0,50$ y con el CPA de $7,31 \pm 0,57$.

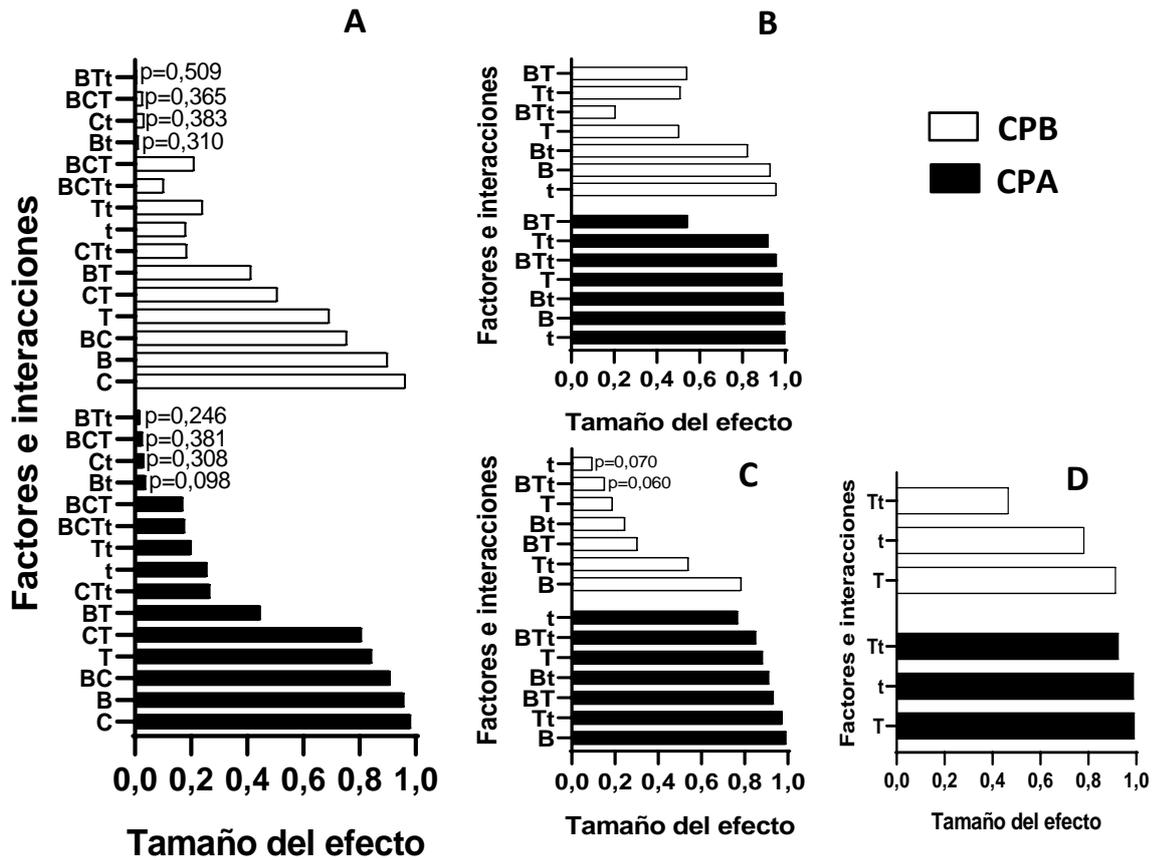


Fig. 1. Tamaño del efecto de los factores y sus interacciones en diferentes pasos del ELISA: (A) recubrimiento de la placa ELISA; (B) unión del antígeno a los anti-rhEGF; (C) unión de los anti-rhEGF al conjugado enzimático y (D) reacción de fosfatasa alcalina con el p-nitrofenil fosfato. Los factores evaluados fueron: B: tampón; C: concentración; T: temperatura de incubación y t: tiempo de incubación. Cada evaluación se realizó utilizando un control positivo bajo (CPB) y uno alto (CPA). La variable dependiente fue la relación señal/ruido, que es la relación entre las señales A405nm de CPB/blanco y CPA/blanco. El tamaño del efecto se midió según el Eta-cuadrado parcial, a partir de un ANOVA factorial completo aplicado a cada paso del ELISA, con una significación estadística de $p \leq 0,05$.

Unión de los anti-rhEGF al conjugado enzimático

En la interacción del conjugado con el CPA se obtuvieron influencias significativas de todos los factores analizados y sus interacciones para la señal del ELISA ($p=0,000$). Sin embargo, con el CPB no se obtuvo una influencia significativa del tiempo de incubación sobre la señal ($p=0,070$), ni en la interacción entre los tres factores ($p=0,060$). En general, con el CPB se observó una menor magnitud del tamaño de los efectos, pero coincide

con el CPA en el orden de importancia de las interacciones: temperatura-tiempo, tampón-temperatura y tampón-tiempo (Fig.1C).

Los resultados de la evaluación de diferentes diluciones para el conjugado enzimático (datos no mostrados) revelaron que la dilución óptima, según el valor más alto de la relación S/R, fue 1:12000, que es la misma que se había encontrado en el ELISA inicial. Las condiciones óptimas para la incubación del conjugado enzimático anti-Inmunoglobulinas humanas-fosfatasa alcalina en la placa ELISA, respaldadas por los valores más altos de señal a ruido (S/R= 10,3±0,6 y S/R= 51,2±0,5 para el CPB y el CPA, respectivamente) fueron las siguientes:

- Tampón de dilución del conjugado: 50 mM de tris-HCl, pH 7,4; 1 M de NaCl, 1% (v/v) de tween-20 y 1% (p/v) de albúmina de suero bovino.
- Tiempo de incubación: 2h
- Dilución para el conjugado enzimático: 1:12000

La relación S/R disminuyó 1,8 veces respecto a la combinación óptima, para ambas concentraciones de antígeno, cuando se utilizó como tampón de dilución 50 mM de tris-HCl, pH 7,4; 0,5 M de NaCl, 0,3% (v/v) de tween-20 y 1% (p/v) de albúmina de suero bovino y una incubación de 2h a TA.

Reacción de la fosfatasa alcalina con el p-nitrofenil fosfato

Al optimizar este paso del ELISA, se confirmó que el tiempo, la temperatura de incubación y su interacción, intervinieron significativamente en el aumento de la señal del ensayo ($p \leq 0,007$). Este comportamiento fue similar para los dos niveles del control positivo incluidos en el estudio (Fig.1D).

En este paso del ELISA, la combinación que produjo la máxima relación S/R (S/R= 5,66±0,50 y S/R= 24,8±0,5 para el CPB y el CPA, respectivamente) fue:

- Tiempo de reacción enzima-sustrato: 1h
- temperatura de incubación: 28°C

La incubación enzima-sustrato por 30 min a TA produjo la relación S/R más baja: 1,85±0,30 y 7,13±0,40 para el CPB y CPA, respectivamente.

Cantidad de lavados

El número de lavados incidió significativamente ($p \geq 0,000$ para ambos controles positivos) en la magnitud de la señal del ELISA. En la figura 2 se muestra el resultado de la comparación múltiple de las medias de la relación S/R, respecto al número de lavados. Tanto para el CPB como en el CPA, el uso de cuatro lavados mostró una señal promedio significativamente superior a las otras dos variantes ($p=0.000$).

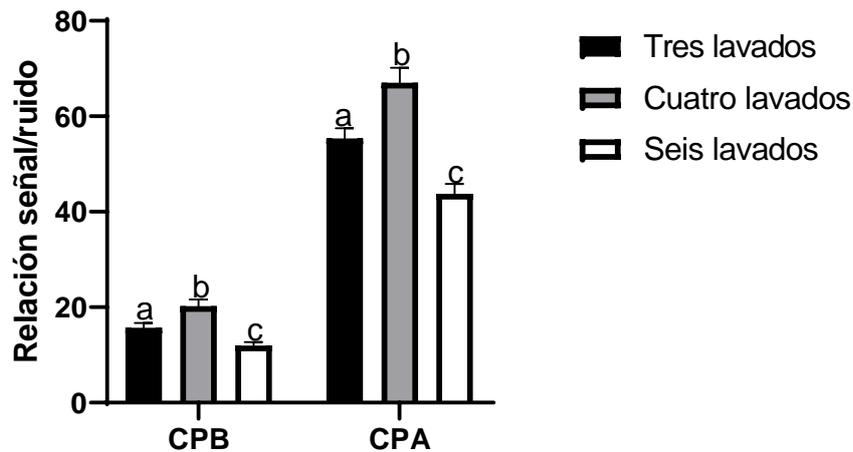


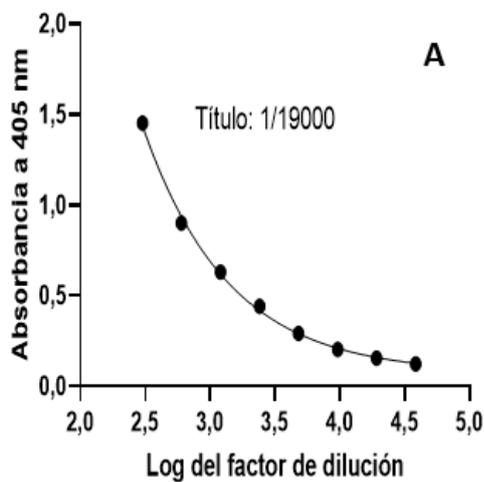
Fig. 2. Efecto del número de lavados de la placa sobre la señal del ELISA. Las barras muestran la media más el límite superior de su intervalo de confianza al 95%. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para cada control positivo, según el test HSD de Tukey. CPB y CPA, significan el control positivo bajo y el alto, respectivamente.

Especificidad

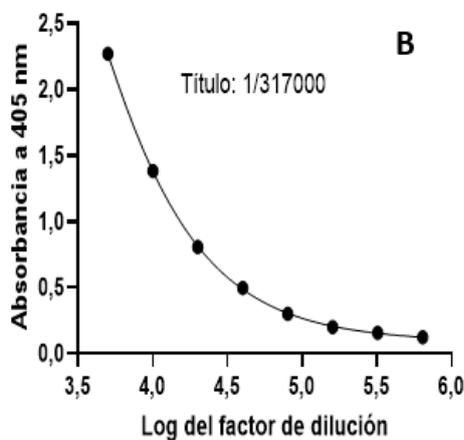
La evaluación de la especificidad se realizó mediante un ensayo de inhibición, que comenzó con la reacción en solución del antígeno rhEGF con los anticuerpos anti-rhEGF de los controles positivos. Con el CPB inhibido se obtuvo un promedio de A405nm de $-0,002 \pm 0,001$ y de $0,081 \pm 0,016$ para el CPB sin inhibir. Estos datos representan un 102,5 % de inhibición. Para el CPA inhibido el valor promedio de la señal fue de $-0,019 \pm 0,006$ y de $1,263 \pm 0,208$, sin inhibición. La inhibición calculada fue de 101,5 %. Este resultado demostró la especificidad del ELISA.

Curvas de titulación de anticuerpos para evaluar el efecto de la optimización del ELISA

Para este ensayo, se prepararon dos curvas de dilución de la mezcla de anticuerpos anti-rhEGF, mediante diluciones en serie 1:2. La primera curva, con un rango de diluciones entre 1:300 a 1:38400, se evaluó mediante el protocolo ELISA inicial (Fig. 3A). Con el ELISA optimizado, se preparó una segunda curva en el rango de 1:5000 a 1:640000 (Fig. 3B). Estas curvas se ajustaron mediante una regresión logística de cinco parámetros y ambas cumplieron con los criterios de aceptación de exactitud y precisión preestablecidos.



Fd	A405nm	ER(%)	CV(%)
300	1,442	-1,22	6,99
600	0,904	5,75	11,01
1200	0,631	-3,04	9,60
2400	0,438	-7,62	3,45
4800	0,295	-2,00	9,05
9600	0,205	6,98	8,11
19200	0,155	8,46	12,25
38400	0,125	5,41	9,17



Fd	A405nm	ER(%)	CV(%)
5000	2,271	0,01	6,90
10000	1,385	-0,11	10,76
20000	0,810	0,88	9,71
40000	0,499	-2,91	8,99
80000	0,303	2,64	9,44
160000	0,203	6,36	10,62
320000	0,160	-7,39	14,35
640000	0,127	-1,98	9,14

Fig. 3. Curvas de titulación de anticuerpos anti-rhEGF con el ELISA inicial (A) y el optimizado (B). Las curvas se ajustaron mediante regresión logística de cinco parámetros. Las tablas

adyacentes muestran los respectivos coeficientes de variación (CV) y el error relativo (ER) de los seis ELISA realizados con cada protocolo, como medida de la precisión y exactitud del factor de dilución (Fd) calculado en cada punto. A405 nm, representa la absorbancia promedio en cada punto de la curva.

La curva correspondiente al protocolo inicial mostró un rango de exactitud modular de $1,22 \leq \%ER \leq 8,46$ y una precisión de $3,45 \leq \%CV \leq 12,25$ (tabla adjunta a la figura 2A), mientras que en el ELISA optimizado los rangos obtenidos fueron de $0,01 \leq \%ER \leq 7,39$ y $6,90 \leq \%CV \leq 14,35$, para exactitud y precisión, respectivamente (tabla adjunta a la figura 2B).

La comparación entre los títulos obtenidos con el ELISA inicial y el optimizado reveló que la detectabilidad del ensayo se incrementó aproximadamente 17 veces en el ensayo optimizado. Las condiciones óptimas para cada paso del ELISA se presentan en la Tabla 1, como compilación de todos los resultados de los diseños factoriales completos aplicados en este estudio.

Tabla 1. Protocolo del ELISA optimizado

Número	Paso del ELISA	Procedimientos
1	Recubrimiento	Recubrir placas Polysorp de Nunc™, en formato de tiras, con 100 µL/pocillo de rhEGF 10 µg/mL, diluido en PBS e incubar 1 h a TA.
2	Lavado	Aplicar cuatro lavados con 380 µL/pocillo de TL 1X.
3	Bloqueo	Bloquear la placa con 380µL/pocillo de SB por 90 min a 37°C.
4	Lavado	Aplicar un lavado con 380 µL/pocillo de TL 1X.
5	Reacción antígeno-anticuerpo	Aplicar 100 µL/pocillo de anticuerpos anti-rhEGF, diluidos en TD. Incubar 2 h at TA.
6	Lavado	Como en el paso 2.
7	Reacción del conjugado con los anticuerpos	Aplicar 100 µL/pocillo del conjugado enzimático, diluido 1:12000 en TD. Incubar 2 h a TA.
8	Lavado	Como en el paso 2.
9	Reacción enzima-sustrato	Incubar la placa en la oscuridad, 1 h a 28 °C, con 100 µL/pocillo de p-nitrofenil fosfato 1 mg/mL, disuelto en dietanolamina 1M, MgCl ₂ 0,5 mM, pH 9,8.

10	Parada de la reacción	Aplicar 100 μ L/pocillo de EDTA 100 mM.
11	Medición de la absorbancia	Medir la absorbancia a 405 nm en un lector de placas.

Discusión

La aplicación del diseño experimental factorial completo en los pasos sucesivos del ELISA fue eficaz para optimizar el ensayo. Un beneficio clave de este tipo de diseño es la capacidad de identificar claramente interacciones importantes entre los parámetros del ensayo que se habrían perdido con el enfoque tradicional de evaluación de solo un factor a la vez (OFAT), como en el ELISA inicial. Este fue ciertamente el caso en nuestro estudio y estudios previos también han hecho esta observación.⁽⁸⁾ Aunque el método OFAT fue útil para estudiar algunos efectos principales del protocolo inicial del ELISA, es un enfoque que implica evaluar cada factor por separado y proporciona poca información sobre cómo interactúan los factores. Sería muy difícil lograr un ELISA robusto y sensible usando esta metodología. En este trabajo, mediante un análisis estadístico clásico y poco complejo, se logra evaluar la relación entre la señal del ensayo y los factores analizados, así como identificar el aporte de los efectos principales de los factores y las interacciones entre ellos, en cada paso del ELISA.

El recubrimiento es el primer paso en cualquier ELISA y para el tipo de placa seleccionada, depende del tiempo, la temperatura, el tampón de recubrimiento y la concentración del agente de recubrimiento. Estos cuatro factores fueron evaluados en este trabajo. Esta fue la etapa del ELISA donde intervino el mayor número de factores y niveles. Su optimización permitió aumentar 1,4 veces la relación S/R a alta concentración de anticuerpos y 1,3 veces a baja concentración. Todos los factores evaluados en esta etapa son aplicables al recubrimiento de antígeno en otro tipo de ELISA.

En el paso de unión del anticuerpo al antígeno de captura, la interacción entre los factores tampón de dilución y el tiempo de incubación, seguida de la interacción entre la temperatura y el tiempo de incubación fueron las más importantes. En la unión del conjugado enzimático a los anticuerpos anti-rhEGF, las interacciones de mayor

influencia en la señal fueron, en orden creciente del tamaño del efecto: temperatura-tiempo, tampón-temperatura y temperatura-tiempo. En el paso de reacción de la enzima fosfatasa alcalina con el sustrato p-nitrofenil fosfato, la interacción entre el tiempo y la temperatura de incubación, tuvo un efecto importante.

La principal desventaja de los experimentos factoriales completos es que no deben evaluar más de seis factores a la vez. ⁽¹⁵⁾ En este estudio, esto no fue un problema porque se analizaron un máximo de cuatro factores simultáneamente y fue solo en el recubrimiento, que es el paso de ELISA donde es obligatorio considerar la mayor cantidad de factores al mismo tiempo. En el resto de los pasos, se redujo el número de factores e interacciones, pero se tuvieron en cuenta parámetros clave, como la preparación del tampón, la temperatura y el tiempo de incubación. Hasta donde sabemos, solo existe un reporte de optimización de ELISA siguiendo el esquema de experimentos factoriales paso a paso, ⁽¹²⁾ el cual fue realizado a un ELISA tipo sándwich. En el trabajo de referencia se planteaba la hipótesis de que el esquema experimental seguido sería útil en la optimización de cualquier formato de ELISA. En el presente trabajo se logra confirmar dicha hipótesis.

Se verificó la especificidad del ELISA optimizado. Además, la validez de la optimización fue confirmada por los resultados de la comparación entre las curvas de titulación de anticuerpos específicos obtenidas con el ELISA inicial y el ELISA optimizado. En los ensayos de unión de ligandos diseñados para estudios farmacocinéticos y diagnósticos clínicos, las agencias reguladoras requieren el desarrollo y la optimización de inmunoensayos que sean capaces de detectar analitos en concentraciones clínicamente relevantes. ⁽¹⁾ En este trabajo se demuestra que la optimización del ELISA, mediante experimentos factoriales completos, logró incrementar considerablemente la detectabilidad con respecto al ensayo mejorado por un método OFAT. Este es un resultado importante para la aplicación del ELISA optimizado en los estudios de evaluación de la inmunogenicidad no deseada contra el Heberprot-P®, en los pacientes tratados con este biofarmacéutico.

Conclusiones

La optimización paso a paso de un ELISA, mediante un diseño factorial completo de experimentos, y la incorporación sucesiva al protocolo de la mejor combinación de factores y niveles, es una estrategia clave para obtener un inmunoensayo específico y de mayor detectabilidad de anticuerpos específicos. Dado que los diseños experimentales se realizan sobre la base de la teoría estadística, el diseño experimental propuesto en este trabajo se ha vinculado a un procesamiento estadístico simple, que facilita la interpretación de los resultados, sobre todo en aquellos laboratorios donde no se dispone de asesoramiento estadístico capacitado.

Referencias bibliográficas

1. Immunogenicity Testing of Therapeutic Protein Products –Developing and Validating Assays for Anti-Drug Antibody Detection. Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, 2019. [citado 5 Jun 2023]. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/119788/download>
2. Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry. US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, 2018. [citado 5 Jun 2023]. Disponible en: <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Bioanalytical-Method-Validation-Guidance-for-Industry.pdf>
3. Fernández-Montequín JI, Valenzuela-Silva CM, Díaz OG, Savigne W, Sancho-Soutelo N, Rivero-Fernández F, *et al.* Cuban Diabetic Foot Study Group. Intra-lesional injections of recombinant human epidermal growth factor promote granulation and healing in advanced diabetic foot ulcers: multicenter, randomised, placebo-controlled, double-blind study. *Int Wound J* 2009; 6(6):432-443. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-481X.2009.00641.x>
4. Bui TQ, Bui QVP, Németh D, Hegyi P, Szakács Z, Rumbus Z, *et al.* Epidermal Growth Factor is Effective in the Treatment of Diabetic Foot Ulcers: Meta-Analysis and Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health* 2019; 16(14):2584. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph16142584>
5. Minic R, Zivkovic I. Optimization, validation and standardization of ELISA. *Norovirus* 2020; 9-28.

6. Cowan KJ, Erickson R, Sue B, Delarosa R, Gunter B, Coleman DA, *et al.* Utilizing design of experiments to characterize assay robustness. *Bioanalysis* 2012; 4(17):2127-2139. <http://dx.doi.org/10.4155/bio.12.199>
7. Shah K, Maghsoudlou P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics. *Br J Hosp Med (Lond)* 2016; 77(7):98-101. <http://dx.doi.org/10.12968/hmed.2016.77.7.C98>
8. Augustine SAJ, Simmons KJ, Eason TN, Griffin SM, Curioso CL, Wymer LJ, *et al.* Statistical approaches to developing a multiplex immunoassay for determining human exposure to environmental pathogens. *J Immunol Methods* 2015; 425:1-9. <http://dx.10.1016/j.jim.2015.06.002>
9. Khuri AI, Mukhopadhyay S. Response surface methodology. *WIREs Comp Stat* 2010; 2:128-149. <http://dx.doi.org/10.1002/wics.73>
10. Papanephytous C. Design of experiments as a tool for optimization in recombinant protein biotechnology: from constructs to crystals. *Mol Biotechnol* 2019; 61(12):873-891. <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-019-00218-x>
11. Ray CA, Patel V, Shih J, Macaraeg C, Wu Y, Thway T, *et al.* Application of multi-factorial design of experiments to successfully optimize immunoassays for robust measurements of therapeutic proteins. *J Pharm Biomed Anal* 2009; 49(2):311-318. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2008.11.039>
12. Hernández CA, Pérez-Bernal M, Abreu D, Valdivia O, Delgado M, Dorta D, *et al.* Step-by-step full factorial design to optimize a quantitative sandwich ELISA. *Anal Biochem* 2023; 674, 115195. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2023.115195>
13. Crombet Ramos T, Rodríguez PC, Neningen Vinageras E, Garcia Verdecia B, Lage Davila A. CIMAvax EGF (EGF-P64K) vaccine for the treatment of non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Vaccines* 2015; 14(10):1303-1311. <http://dx.doi.org/10.1586/14760584.2015.1079488>
14. DeSilva B, Smith W, Weiner R, Kelley M, Smolec J, Lee B, *et al.* Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. *Pharm Res* 2003; 20(11):1885-900. <http://dx.doi.org/10.1023/b:pham.0000003390.51761.3d>

15. Altekhar M, Homon CA, Kashem MA, Mason SW, Nelson RM, Patnaude LA, *et al.* Assay optimization: a statistical design of experiments approach. Clin Lab Med 2007; 27(1):139-54. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2007.01.001>

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflicto de intereses en relación con la investigación

Contribución de autoría

Conceptualización: Carlos Alberto Hernández, Maylin Pérez-Bernal

Curación de datos: Carlos Alberto Hernández, Maylin Pérez-Bernal

Análisis formal: Carlos Alberto Hernández

Investigación: Carlos Alberto Hernández, Maylin Pérez-Bernal, Magali Delgado

Metodología: Carlos Alberto Hernández

Administración del proyecto: Enrique Pérez

Recursos: José Manuel Sánchez, Magali Delgado

Supervisión: Enrique Pérez, José Manuel Sánchez

Validación: Enrique Pérez

Visualización: Maylin Pérez-Bernal

Redacción – borrador original: Carlos Alberto Hernández, Maylin Pérez-Bernal

Redacción – revisión y edición: Carlos Alberto Hernández, Maylin Pérez-Bernal