

Desarrollo de dos métodos analíticos  
basados en la espectrometría de masas/SIM  
para los estudios farmacocinéticos en  
humanos de los candidatos terapéuticos  
peptídicos CIGB-500 y CIGB-300:  
Validación según las normas de la FDA

**Autores Principales:**Ania Cabrales Rico

**Otros Autores:** Luis Javier González, Jeovanis Gil Valdés, Hilda Garay Pérez, Vladimir Besada Pérez, Osvaldo Reyes Acosta, Jorge Berlanga Acosta, Silvio Perea Rodríguez, Francisco Hernández Bernal, Lidia González Menéndez, Carmen Valenzuela Silva y Eduardo Fernández Sánchez

**Colaboradores:** 25

**Filiaciones:**

<sup>1</sup> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

**Autor para la correspondencia:**

Ania Cabrales Rico (CIGB)  
Ave. 31, e/ 158 y 190, Rpto. Cubanacán, Playa, La Habana  
Teléfono: 271 6022, Ext./ 1124 Fax: 271 4764  
E-mail: ania.cabrales@cigb.edu.cu

## 1. Resumen

El CIGB le ha apostado al empleo de los péptidos sintéticos como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, desórdenes autoinmunes y trastornos cardiovasculares, entre otras. Varios candidatos terapéuticos peptídicos se encuentran en la etapa de solicitud de autorización de estudios clínicos o han rebasado satisfactoriamente la fase I. En esta etapa, tanto la seguridad del fármaco como su perfil farmacocinético, son aspectos exigidos por las entidades regulatorias. Si bien el marcaje radioactivo sigue siendo el método más utilizado en estudios de farmacocinética preclínica, este no es selectivo, puede alterar el perfil farmacocinético del fármaco y su aplicación en seres humanos es limitada. Esta desventaja, aparejada a la elevada diversidad estructural y funcional de los péptidos, así como a su rápida eliminación, hacen necesario el desarrollo de nuevos métodos analíticos con este propósito. La espectrometría de masas (MS) posee elevadas selectividad, sensibilidad y velocidad de análisis, aunque su empleo para la cuantificación de estas moléculas en el contexto del plasma, constituye un reto analítico. De ahí que los métodos analíticos basados en MS deban adaptarse a las propiedades físico-químicas de la molécula de interés y a las características de la matriz biológica en que se encuentra. En el presente trabajo se desarrollaron dos métodos analíticos para la cuantificación absoluta en plasma humano de dos candidatos terapéuticos peptídicos: el CIGB-500 (citoprotector) y el CIGB-300 (antineoplásico). Ambas metodologías se validaron según las exigentes normas de la FDA. El método para el CIGB-500 se basó en el acoplamiento de la cromatografía líquida a la espectrometría de masas (LC-MS), mientras que para el CIGB-300 solo se empleó la espectrometría de masas MALDI-MS. En ambos casos se utilizó el monitoreo de la señal del péptido intacto (SIM), lo que garantizó la elevada selectividad del análisis. La utilización del MALDI-MS sin el empleo de la cromatografía líquida constituye un elemento de novedad científica del trabajo, por su simplicidad y su generalidad para el estudio del perfil farmacocinético de péptidos catiónicos. Estos métodos fueron aplicados en los estudios de farmacocinética durante los ensayos clínicos fase I de ambos candidatos. Para el péptido CIGB-500, el método desarrollado permitió detectar el posible reciclaje enterohepático de la molécula intacta y para el CIGB-300 se demostró que este no se acumuló de una administración a la otra, siguiendo el régimen de administración propuesto. Los resultados aquí presentados se incluyeron en los informes finales de ambos ensayos clínicos. Además han sido publicados en 3 artículos en

revistas internacionales arbitradas de impacto, se presentaron en el FORUM de Ciencia y Técnica a varios niveles, así como en otros eventos científicos con carácter nacional e internacional. En nuestro país es la primera vez que se utiliza la espectrometría de masas para el estudio del perfil farmacocinético de péptidos terapéuticos.

## **2. Comunicación Corta**

### **2.1. Introducción**

Dentro de la proyección estratégica de investigación y desarrollo del CIGB, una de las variantes es el empleo de los péptidos sintéticos como agentes terapéuticos para el tratamiento, entre otras enfermedades, del cáncer, los desórdenes autoinmunes y los trastornos cardiovasculares. Varios candidatos terapéuticos, basados en péptidos sintéticos, se encuentran en la etapa de solicitud de autorización para realizar estudios clínicos o han rebasado satisfactoriamente la fase I de estos. Uno de los objetivos principales de estos ensayos es la realización de estudios de farmacocinética, donde se hace necesario el análisis de estas moléculas y su cuantificación en muestras biológicas complejas. Sin embargo, la diversidad estructural y funcional de los péptidos, unida a que son moléculas pequeñas, poco inmunogénicas y de rápida eliminación en el organismo, dificulta su seguimiento en este tipo de muestras.

Teniendo en cuenta que durante los estudios de farmacocinética no solo es necesario detectar los compuestos de interés en distintos fluidos biológicos sino que además estos deben ser cuantificados de forma confiable en una gran cantidad de muestras; se hace cada vez más necesario el desarrollo de métodos de análisis eficientes que se caractericen por una elevada sensibilidad y la mayor velocidad de análisis posible, para garantizar la culminación del estudio y la obtención de los resultados en un tiempo razonable. Además del desarrollo de herramientas analíticas con este objetivo, también es importante su validación según las normas de entidades regulatorias internacionales (Ej./ la FDA, EMEA, etc.). Este aspecto ubica el resultado de la aplicación de estos métodos en el contexto regulatorio adecuado para el registro de estos productos y su futura comercialización en el mercado internacional.

Actualmente la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC -MS) se ha convertido en la metodología de análisis por excelencia para

los péptidos durante las distintas etapas de su desarrollo clínico. Este tipo de método resulta conveniente en los estudios de farmacocinética, puesto que es aplicable a una amplia gama de compuestos de diferente naturaleza química. En este caso, la cuantificación de la molécula se realiza mediante la adición de una concentración conocida del estándar interno (EI) a la muestra. Por lo general el EI que se utiliza es el mismo compuesto que se desea cuantificar, pero marcado con isótopos estables, de modo que se garantice igual recobrado durante el procesamiento de la muestra, idéntico comportamiento cromatográfico y la misma eficiencia en la ionización durante su análisis por espectrometría de masas. También pueden emplearse compuestos químicamente relacionados al analito o incluso metabolitos de este [1].

A partir de los aspectos comentados con anterioridad, se definieron como objetivos de este trabajo: (1) Desarrollar metodologías de análisis altamente específicas y sensibles, basadas en la espectrometría de masas, que sean validables de acuerdo a las normas de la FDA y (2) Aplicarlas al análisis de muestras clínicas provenientes de los ensayos clínicos fase I de los candidatos terapéuticos peptídicos CIGB-500 y CIGB-300.

## 2.2. Resultados

Este trabajo aborda el desarrollo de métodos analíticos basados en la espectrometría de masas para la determinación de candidatos terapéuticos peptídicos en plasma humano, con el objetivo de realizar la cuantificación de estas moléculas durante los estudios de farmacocinética incluidos en los ensayos clínicos fase I.

En el caso del CIGB-500, péptido con actividad citoprotectora demostrada en diversos modelos experimentales [2, 3], se desarrolló una metodología basada en el método AQUA<sup>®</sup> [4, 5], donde se utilizó la espectrometría de masas acoplada a la cromatografía líquida (LC-MS) para separar el péptido de interés de otros componentes del plasma. Aquí se cuantificó el CIGB-500 con la utilización de un estándar interno similar al péptido, pero marcado con  $^{13}\text{C}_3$ -Ala (Figura 1).

El método fue validado de acuerdo a los requerimientos de la FDA [6] y aplicado con éxito al análisis de muestras clínicas provenientes del estudio de farmacocinética realizado en nueve individuos sanos con este candidato terapéutico, a los niveles de dosis de 100, 200 y 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso corporal.

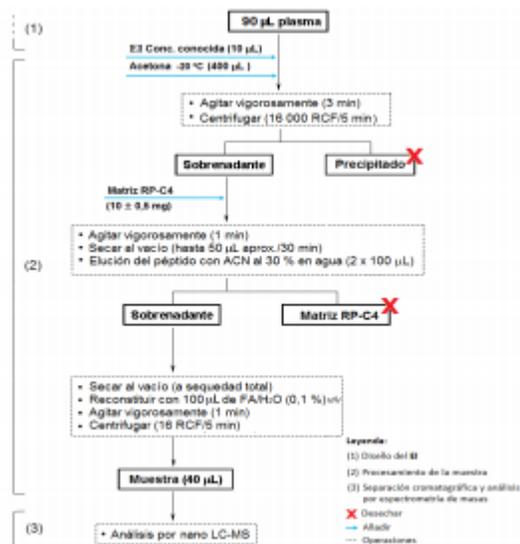


Figura 1: Diagrama de flujo del método implementado para la cuantificación del péptido CIGB-500 en plasma humano. La muestra de plasma de partida contiene el péptido de interés y solo se le añade el EI, a la concentración apropiada, para realizar la cuantificación absoluta

Por otra parte, se desarrolló un método analítico para el péptido pro-apoptótico CIGB-300, inhibidor de la fosforilación mediada por CK-2 y con actividad anti-tumoral ampliamente demostrada en modelos animales y durante su aplicación clínica [7, 8, 9]. En este caso, el método se basó en la espectrometría de masas MALDI-TOF, con el empleo de un estándar interno que consistió en el propio péptido acetilado en el extremo N-terminal. No se requirió ningún paso de cromatografía para separar el péptido de interés de otros componentes mayoritarios del plasma y solamente se utilizó la precipitación ácida directamente seguida del análisis por espectrometría de masas, para realizar la determinación (Figura 2).

Este método también fue validado de acuerdo a los requerimientos de la FDA [6] y aplicado con éxito al análisis de muestras clínicas provenientes del estudio de farmacocinética realizado en cuatro pacientes con tumores sólidos en estadio avanzado. Aquí se estudiaron la primera y la quinta administración del péptido por vía endovenosa, a una dosis de 1,6 mg/kg de peso corporal. Debido a las diferencias entre estos dos péptidos en cuanto a su tamaño,

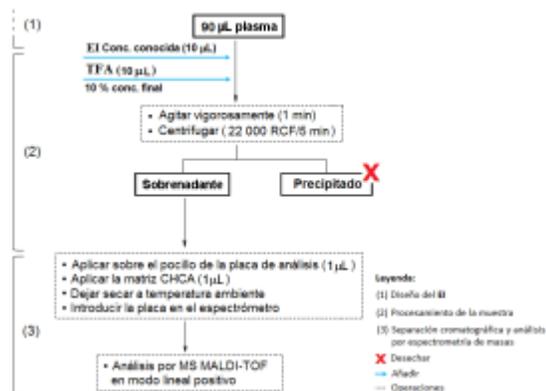


Figura 2: Diagrama de flujo del método implementado para la cuantificación del péptido CIGB-300 en plasma humano. Se asume que la muestra de plasma de partida ya contiene el péptido CIGB-300 y solamente se le añade el EI a la concentración apropiada

presencia de aminoácidos cargados, etc.; se requirió el desarrollo de metodologías diferentes para el análisis y la cuantificación de cada uno de ellos, lo que proporciona una mayor versatilidad al resultado que se propone en este trabajo.

### 2.3. Aporte metodológico, científico y social

El aporte de este trabajo, desde el punto de vista metodológico, está condicionado al desarrollo de novedosos métodos de análisis para estos candidatos terapéuticos peptídicos en plasma humano, utilizando la espectrometría de masas ESI y MALDI como herramientas analíticas de base. Esto proporcionó un nivel de selectividad y sensibilidad a los métodos desarrollados que nunca antes se había podido alcanzar con las herramientas analíticas convencionales, como el marcaje radioactivo, que en el péptido CIGB-500 se empleó en estudios de farmacocinética y biodistribución durante la investigación preclínica; y que para el péptido CIGB-300 se empleó en el ensayo clínico fase I aplicado directamente en las lesiones malignas del cuello uterino. En los métodos analíticos basados en la espectrometría de masas, lo que se cuantifica es el péptido íntegro, a la vez que se confirma su identidad y se pueden identificar los principales metabolitos en que se transforma. Otro aporte desde el punto

de vista metodológico lo constituye el diseño de un estándar interno específico y adecuado a cada estrategia, lo que permitió la cuantificación confiable de cada uno de los péptidos en las muestras de plasma. Ambos métodos pueden servir de plataforma analítica para la cuantificación de otros péptidos biológicamente activos con características similares; a partir del conocimiento de los parámetros críticos a tener en cuenta para el procesamiento de la muestra, el diseño de los estándares internos, así como el método de detección.

Desde el punto de vista científico, el aporte de este trabajo está sustentado en la versatilidad de los métodos analíticos desarrollados, lo que sentó las bases para el análisis de cualquier tipo de péptido, individualizando la estrategia a seguir en dependencia de sus características fisicoquímicas, las particularidades de su secuencia aminoacídica, así como de su comportamiento durante el análisis cromatográfico o por espectrometría de masas. Otro aporte científico es el empleo por primera vez de una metodología de análisis basada en la espectrometría de masas MALDI-TOF/SIM para la cuantificación de un péptido en plasma humano; con un procesamiento muy simple de la muestra al no requerir separación cromatográfica previa. Este pudiera ser un procedimiento general para la cuantificación en plasma de péptidos catiónicos que tengan dianas moleculares intracelulares. Además se demostró la factibilidad del empleo de estándares internos relacionados al analito (péptido acetilado en el N-terminal) para realizar la cuantificación, aún cuando tengan diferencias en cuanto a la ionización. Por otra parte se aplicaron de forma creativa las normas de validación de la FDA para métodos basados en LC-MS, a un método que solo empleó MS, constituyendo este otro de los aportes científicos del presente trabajo.

Por otra parte, el aporte social de este resultado radica en que ambos métodos se validaron de acuerdo a las normas de la FDA y se aplicaron a la cuantificación de estos candidatos terapéuticos peptídicos en el contexto de los estudios clínicos fase I. De esta forma, se cuenta con una herramienta analítica cuantitativa propia (de nuestra institución), a la altura de lo que exigen las entidades regulatorias internacionales, para la cuantificación de estos péptidos en plasma humano. Esto aporta valor agregado a la investigación y pone en ventaja al producto a la hora de su registro sanitario con vistas a su posterior comercialización. Además, la documentación asociada a la validación de estos métodos avala su aplicación para el propósito con que fueron creados, y ofrece un nivel de confiabilidad elevado a los resultados obtenidos de esta. Una determinación más confiable de los parámetros farmacocinéticos tiene un impacto directo en la estimación acertada de la dosis óptima

para los candidatos peptídicos estudiados. Los resultados de la aplicación de estos métodos forman parte del informe final presentado a nuestra entidad regulatoria al término del ensayo clínico fase I realizado con ambos péptidos.

## 2.4. Conclusiones

Los resultados obtenidos de la cuantificación de ambos péptidos en las muestras clínicas permitieron la caracterización farmacocinética de estas moléculas en los niveles de dosis estudiados. Esta información, incorporada al expediente del ensayo clínico fase I en cada caso, complementa ambos estudios y le añade confiabilidad adicional al resultado, por tratarse de métodos validados según las normas vigentes de la FDA[6].

Además, con el método basado en la espectrometría de masas MALDI-TOF para la cuantificación del péptido CIGB-300 en plasma humano se sentaron las bases metodológicas para el análisis de otros péptidos catiónicos, como los péptidos penetradores de células, cuyos blancos terapéuticos tienen localización intracelular.

El presente trabajo no interfiere con otros premios de la Academia de Ciencias de Cuba otorgados previamente a trabajos relacionados con los candidatos terapéuticos peptídicos CIGB-500 y/o CIGB-300, pues centra su novedad científica y su aporte metodológico y social, en el desarrollo de novedosos métodos de análisis para la cuantificación de estas moléculas en plasma humano, en el marco de los ensayos clínicos fase I; donde los estudios de farmacocinética constituyen uno de los objetivos fundamentales.

## Referencias

- [1] Wan H y Desiderio DM. Quantification of [Dmt1] DALDA in ovine plasma by on-line liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communication on Mass Spectrometry* 17(6): 538-546 (2003)
- [2] Marleau S, Mulumba M, Lamontagne D y Ong H. Cardiac and peripheral actions of growth hormone and its releasing peptides: Relevance for the treatment of cardiomyopathies. *Cardiovascular Research* 69(1): 26-35 (2006)
- [3] Berlanga J, Cibrián D, Guevara L, Domínguez H, Alba JS, Seralena A, Guillén G, López-Mola E, López-Saura P, Rodríguez A, Pérez B, García D y

- Vispo NS. Growth-hormone-releasing peptide 6 (GHRP6) prevents oxidant cytotoxicity and reduces myocardial necrosis in a model of acute myocardial infarction. *Clinical Science* 112: 241-250 (2007)
- [4] Li X, Zhang H, Ranish JA y Aebersold R. Automated statistical analysis of protein abundance ratios from data generated by stable-isotope dilution and tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 75: 6648-6657 (2003)
- [5] Heavy Peptide®/AQUA®: Kits for Quantitation in Proteomics. Technical Information (TI-PEP03-0105), Thermo-Electron Corporation (2005)
- [6] U.S. Department of health and human services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Center for Veterinary Medicine (CVM). Guidance for Industry on Bioanalytical Method Validation (Draft Guidance) FDA (2013)
- [7] Perera Y, Farina H.G., Gil J., Rodríguez A., Castellanos L., Gómez R.E., Alonso D.F., Acevedo B.E. and Perea S.E. Anticancer peptide CIGB-300 binds to nucleophosmin/B23, impairs its CK2-mediated phosphorylation, and leads to apoptosis through its nucleolar disassembly activity. *Molecular Cancer Therapy* 8 (5): 1189-1196 (2009)
- [8] Perera Y., Costales H.C., Díaz Y., Reyes O., Farina H.G., Méndez L., Gómez R.E., Acevedo B.E., Gómez D.E., Alonso D.F. and Perea S.E. Sensitivity of tumor cells towards CIGB-300 anticancer peptide relies on its nucleolar localization. *Journal of Peptide Science* 18: 215-223 (2012)
- [9] Perea SE, Reyes O, Baladron I, Perera Y, Farina H, Gil J, Rodriguez A, Bacardi D, Marcelo JL, Cosme K, Cruz M, Valenzuela C, Lopez-Saura PA, Puchades Y, Serrano JM, Mendoza O, Castellanos L, Sanchez A, Betancourt L, Besada V, Silva R, Lopez E, Falcon V, Hernandez I, Solares M, Santana A, Diaz A, Ramos T, Lopez C, Ariosa J, Gonzalez LJ, Garay H, Gomez D, Gomez R, Alonso DF, Sigman H, Herrera L y Acevedo BE CIGB-300, a novel pro-apoptotic peptide that impairs the CK2 phosphorylation and exhibits anticancer properties both in vitro and in vivo. *Molecular and Cell Biochemistry* 316: 163–167 (2008)
- [10] Gil J, Cabrales A, Reyes O, Morera V, Betancourt L, Sánchez A, García G, Moya G, Padrón G, Besada V and González LJ (2012) Development and validation of a bioanalytical LC-MS method for the quantification

of GHRP-6 in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 60: 19-25 (2012)

- [11] Ania Cabrales, Jeovanis Gil, Eduardo Fernández, Carmen Valenzuela, Francisco Hernández, Idrían García, Ariadna Hernández, Vladimir Besada, Osvaldo Reyes, Gabriel Padrón, Jorge Berlanga, Gerardo Guillén and Luis Javier González. Pharmacokinetic study of Growth Hormone-Releasing Peptide 6 (GHRP-6), in nine male healthy volunteers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 48: 40-6 (2013)
- [12] Ania Cabrales-Rico, Beatriz G. de la Torre, Hilda E. Garay, Yoan J. Machado, Jose A. Gómez, Enrique Audain, Orlando Morales, Vladimir Besada, Jose Luis Marcelo, Vilcy Reyes, Yasser Perera, Silvio E. Perea, Osvaldo Reyes and Luis Javier González. Bio-analytical method based on MALDI-MS analysis for the quantification of CIGB-300 anti-tumor peptide in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 105: 107–114 (2015)
- [13] Soriano-García JL, López-Díaz A, Solares-Asteasuainzarra M, Baladrón-Castrillo I, Batista-Albuerne N, García-García I, González-Méndez L, Perera-Negrín Y, Valenzuela-Silva CM, Pedro AP, Quevedo-Sotolongo LS, Hernández-González I, Silveira-Pablos JM, Chong-López A, Alonso DF, Gómez RE, Renault JY, Perrin P, Sigman H, Gold S, Perea-Rodríguez SE, Acevedo-Castro BE, Herrera-Martínez L, López-Saura PA. Pharmacological and safety evaluation of CIGB-300, a casein kinase 2 inhibitor peptide, administered intralesionally to patients with cervical cancer stage IB2/II. *Journal of Cancer Research & Therapy* 1(6): 163– 173 (2013)
- [14] Reyes V, Perera Y, Díaz E, Rosales I, García G, Perea SE, Implementación de un ELISA de competencia para estudios de farmacocinética del péptido CIGB-300 en plasma humano. *Biotecnología Aplicada* 31: 227-231 (2014)