

VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA CÁLCULO DE CONCENTRAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL CONJUGADO

Lais F. Alcarde¹, Adriana V. F. Massicano¹, Ricardo S. Oliveira¹, Elaine B. de Araújo¹

¹ Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN / CNEN - SP)
Av. Professor Lineu Prestes 2242
05508-000 São Paulo, SP
lais_alcarde@hotmail.com

ABSTRACT

O uso de anticorpos monoclonais (AcM) como radiofármacos vem crescendo, em razão de sua extraordinária eficácia e especificidade. O Rituximabe (Mabthera® - Roche) é um AcM quimérico específico para o antígeno CD20, uma proteína transmembranar hidrofóbica localizada em linfócitos B maduros. Foi aprovado em 1998 pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para imunoterapia de Linfoma Não-Hodgkin (LNH) de células B. Este AcM liga-se a 95% das células B e 90% das células B de LNH, promovendo morte celular por três mecanismos diferentes: citotoxicidade complemento-dependente, citotoxicidade celular anticorpo-dependente e pela indução da apoptose. O processo de purificação, utilizado no preparo do AcM para radiomarcagem, por meio de cromatografia de exclusão molecular ou ultrafiltração, é passível de perda proteica ou quebra do anticorpo, sendo assim indicada a determinação da massa proteica, para assegurar efetividade na radiomarcagem. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método analítico quantitativo utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação da concentração de anticorpo conjugado com o quelante bifuncional. Os ensaios foram realizados utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência, e as seguintes condições foram utilizadas: fluxo de 1 mL/minuto, tempo de corrida de 15 minutos, tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0 como fase móvel e coluna de exclusão molecular BioSep SEC-S 3000 (300 x 7,8 mm, 5 µm - Phenomenex). A curva de calibração foi obtida com o AcM diluído em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0, através de diluição seriada, obtendo as respectivas concentrações: 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL. A partir da curva de calibração calculou-se a equação da reta e com ela a concentração do imunoconjugado. Para garantir a validade do método foram realizados estudos de exatidão e precisão. O ensaio de exatidão consistiu na avaliação de 3 amostras de concentração conhecida, sendo este ensaio realizado com concentrações baixas (50 µg/mL), médias (100 µg/mL) e altas (200 µg/mL). O ensaio de precisão consistiu em 3 avaliações consecutivas de 1 amostra de concentração conhecida, respeitando as condições estabelecidas anteriormente para os demais ensaios. O coeficiente de correlação da curva de calibração foi superior a 97%, a exatidão do método foi satisfatória para concentrações baixas, bem como a precisão. O método foi validado, mostrando-se exato e preciso para a determinação da concentração do imunoconjugado. Além disso, este ensaio mostrou-se de extrema importância, pois utilizando-se a massa correta da proteína, a pureza radioquímica do radioimunoconjugado foi superior a 95% em todos os estudos.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a radioimunoterapia (RIT) tem sido avaliada como alternativa viável para tratamento de tumores malignos. Esta modalidade terapêutica tem crescido rapidamente em razão de sua extraordinária eficácia e especificidade, levando à aprovação de novas drogas pelo FDA e aplicadas na terapia para cânceres [1,2,3].

O princípio da RIT é combinar os mecanismos de ação do anticorpo monoclonal não radiomarcado com os efeitos biológicos propiciados pela radiação na terapia contra o câncer [4,5].

O Rituximabe é um AcM quimérico capaz de reconhecer o antígeno CD20 que é uma proteína transmembranar de superfície celular, expresso por células B em vários estágios de diferenciação e em tumores derivados delas, em célula B em estágio inicial de maturação, célula B em estágio intermediário de maturação, célula B madura e célula B plasmocitóide [5,6]. Ele foi aprovado pelo FDA para tratamento do Linfoma Não Hodgkin de células B, baixo grau ou folicular CD20 positivo, LNH difuso de grandes células B, CD20 positivo e LNH de células B, folicular, CD20 positivos [7].

Este AcM liga-se a 95% das células B e 90% das células B de LNH, promovendo morte celular por três mecanismos diferentes: citotoxicidade complemento-dependente, citotoxicidade celular anticorpo-dependente e pela indução da apoptose [8].

Quelantes bifuncionais conjugados a estrutura do AcM são utilizados para ligar radiometais como ^{177}Lu , ^{90}Y e ^{111}In na cadeia do anticorpo, resultando numa ligação estável entre eles. Os mais comuns são os derivados do DTPA (ácido dietilenotriaminopentacético) e DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecanotetraacético) [2].

O processo de purificação utilizado no preparo do imunoconjugado para radiomarcagem, por meio de cromatografia de exclusão molecular ou ultrafiltração é passível de perda proteica ou quebra do anticorpo. Sendo assim, é indicada a determinação da massa proteica após o procedimento de purificação, para assegurar efetividade na radiomarcagem.

A utilização de método de espectrofotometria de absorção UV para determinação da concentração proteica do imunoconjugado purificado demonstrou-se ineficiente com grande variabilidade nas medidas realizadas.

Por outro lado, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) possui destaque na química analítica devido a capacidade de realizar análises quantitativas e qualitativas com alta eficiência [9].

O tempo de retenção de uma determinada substância obtido por CLAE, quando comparado a um padrão estabelecida nas mesmas condições, pode identificar uma possível substância e a área sob a curva pode ser utilizada para quantificar a amostra [9].

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método em CLAE para determinação da concentração proteica após o procedimento de conjugação e purificação do imunoconjugado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção da Curva Padrão

Os ensaios foram realizados em um sistema de CLAE (Shimadzu) qualificado, equipado com uma coluna de exclusão molecular BioSep SEC-S 3000 (Phenomenex, 300 x 7,8 mm, 5 μm) e detector UV com comprimento de onda 280 nm. O fluxo foi de 1 mL/min utilizando como fase móvel tampão

fosfato de sódio pH 7,0 por 15 minutos. As pipetas utilizadas para diluição seriada foram devidamente calibradas.

A curva de calibração foi obtida com o AcM (Rituximabe) diluído em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,0, através de diluição seriada, obtendo-se as seguintes concentrações: 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL. A partir da curva de calibração analisaram-se todas as amostras no sistema de CLAE e a partir da área de integração do pico obtido no cromatograma calculou-se a equação da reta e com ela a concentração do imunoconjugado [9,10].

2.2 Linearidade

O parâmetro de linearidade foi executado em triplicata, através da elaboração das curvas padrões, obtendo-se as seguintes concentrações: 400 µg/mL, 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL. A partir das curvas determinou-se a equação da reta e o coeficiente de correlação. Quanto mais próximo de 1 o coeficiente de correlação, maior a linearidade. [10].

2.3 Exatidão

A exatidão foi avaliada através do método de recuperação. O teste de recuperação consistiu na análise em triplicata de amostras de concentrações conhecidas, sendo realizado com concentrações baixas (25 µg/mL), médias (37,5 µg/mL) e altas (62,5 µg/mL). O percentual de recuperação foi estabelecido a partir da equação [10,11]:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{(\text{valor obtido} - \text{valor real})}{\text{valor real}} \times 100 \quad (1)$$

2.4 Especificidade e Seletividade

Os ensaios consistiram na avaliação de três amostras de 50 µg/mL de anticorpo contaminadas com 5 µg/mL de DOTA-NHS-éster. Essas amostras "contaminadas" foram analisadas com o intuito de verificar se o método analítico era capaz de identificar ambos os analitos [9].

2.5 Limite de Detecção e Quantificação

Os limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados a partir dos dados obtidos das curvas padrão, através das seguintes equações [10,11]:

$$LD = (DPa \times 3) / IC \quad e \quad LQ = (DPa \times 10) / IC \quad (2)$$

Onde:

DPa = desvio padrão médio do intercepto de três curvas padrão.

IC = inclinação média obtida nas três curvas padrão.

2.6 Reprodutibilidade

Este parâmetro foi avaliado a partir da análise de 3 amostras de concentrações conhecidas e em diferentes concentrações 25 µg/mL, 37,5 µg/mL 62,5 µg/ mL. Os ensaios foram realizados em dias diferentes, por analistas diferentes, porém com o mesmo equipamento. Os resultados foram expressos através do coeficiente de variação do percentual obtido, calculado a partir da equação [9]:

$$CV (\%) = \frac{DP}{Média} \times 100 = \quad (3)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados [12].

A cromatografia é um método físico-químico de separação realizado através de uma fase móvel e uma estacionária, por onde os componentes serão distribuídos. Pode ser classificada de acordo com a fase móvel utilizada, podendo ser gasosa ou líquida [10].

O ensaio de determinação de linearidade foi executado através da elaboração de curvas padrões, nas quais foram estabelecidas a correlação entre as áreas dos picos expressos no cromatograma. Segundo a RDC 899, de 29 de maio de 2003, o coeficiente de correlação (r) da curva de calibração para ser considerado aceitável deve corresponder no mínimo a 0,99, sendo o valor obtido no experimento de $0,992 \pm 0,01$.

Este parâmetro demonstrou que os resultados obtidos na metodologia analítica proposta são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, conforme demonstrado na FIG. 1.

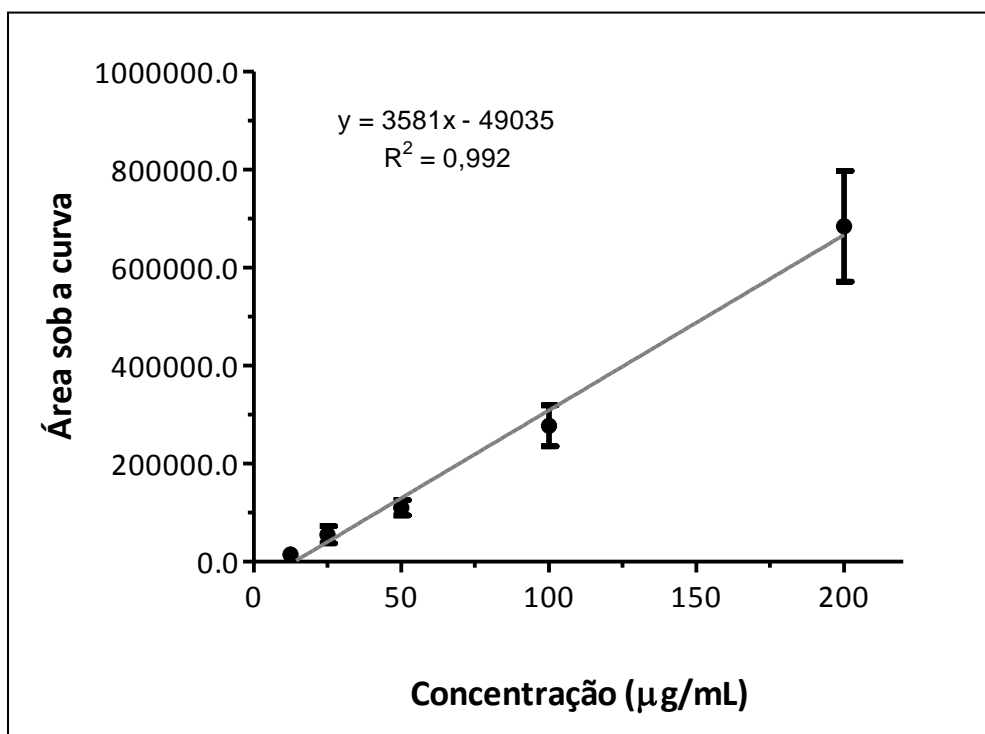


Figura 1: Curva padrão construída com diferentes concentrações de anticorpo.

Os resultados do teste de exatidão estão expressos na TAB.1. O método demonstrou-se mais exato quando analisou-se concentrações menores (113,94 % na concentração de 25 µg/mL). Houve um decréscimo na recuperação conforme a concentração aumentou.

A média do percentual recuperado foi de 113,94% na concentração de 25 µg/mL, 68,98% na concentração de 37,5 µg/mL e 43,96% na concentração de 62,5 µg/mL, mostrando que a concordância entre os valores experimentais e os valores teóricos de concentração, foi melhor para concentração mais baixa analisada.

Tabela 1: Teste de exatidão para várias massas. Resultados expressos em Média ± DP (n = 3).

Concentração real	Média da recuperação (%)
25 µg/mL	113,94±9,87
37,5 µg/mL	68,98±8,76
62,5 µg/mL	49,96±0,39

Um método considerado específico é aquele que produz resposta para apenas um analito, enquanto um método considerado seletivo é aquele que produz resposta para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta do analito de interesse.

Quando a amostra foi contaminada com quelante, foi possível observar uma boa separação das duas espécies, que apresentaram diferentes tempos de retenção (TAB.2 e FIG.2). Isto indica que o método empregado é específico e seletivo.

Tabela 2: Tempos de retenção (TR) do anticorpo e do DOTA-NHS-éster. Resultados expressos em média \pm DP (n = 3).

TR Pico 1 (minutos)	TR Pico 2 (minutos)
<i>Anticorpo</i>	<i>DOTA-NHS-éster</i>
7,16 \pm 0,12	11,99 \pm 0,09

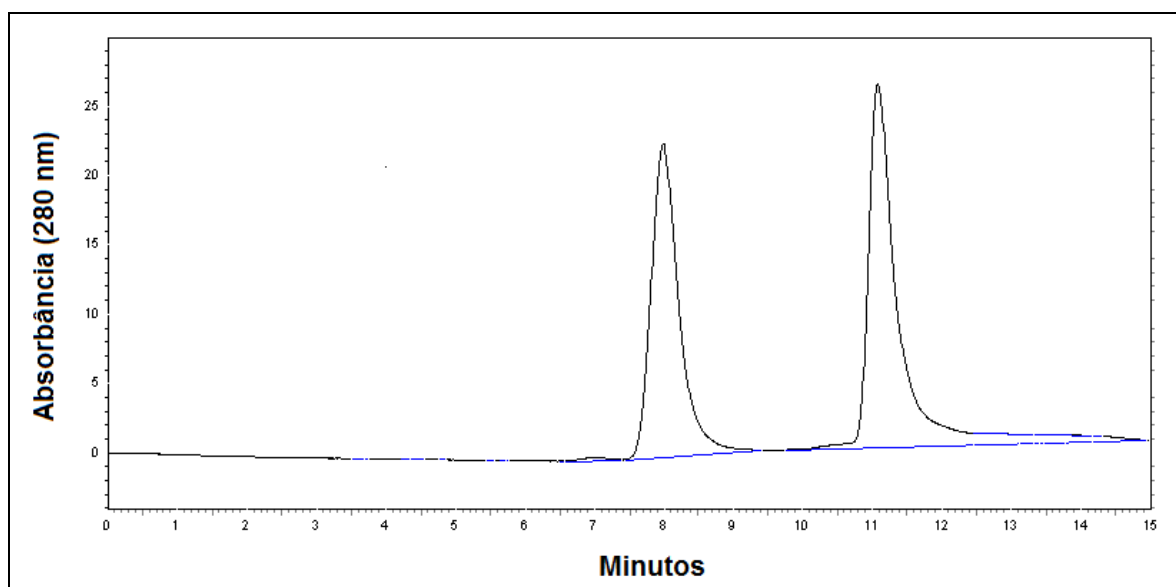


Figura 2: Cromatograma do imunoconjugado contaminado com DOTA-NHS-éster.

A recuperação do método foi analisada nesta amostra contaminada e a exatidão encontrada foi adequada (94,22% \pm 19,62).

Tendo em vista que o método será utilizado para analisar uma amostra com possível contaminação de quelante, a seletividade é uma importante qualidade.

Os valores calculados para o limite de detecção e de quantificação demonstram sensibilidade e especificidade do método satisfatório para a determinação da concentração proteica, visto que o método proposto não tem como objetivo detectar concentrações mínimas.

Foi estabelecido como limite de detecção 21,20 $\mu\text{g/mL}$ e o limite de quantificação estabelecido foi 70,66 $\mu\text{g/mL}$.

O método apresentou alta reprodutibilidade quando analisou-se concentrações próximas ao limite de detecção e quantificação (TAB. 3). Quando uma concentração intermediária foi analisada, a reprodutibilidade não foi satisfatória.

Tabela 3: Reprodutibilidade do método em diferentes concentrações (n = 3).

Concentração	Coefficiente de variação
25 $\mu\text{g/mL}$	8,66 %
37,5 $\mu\text{g/mL}$	12,69 %
62,5 $\mu\text{g/mL}$	0,79 %

4. CONCLUSÃO

Os ensaios realizados permitem concluir que o método de CLAE empregado, mostrou-se exato, preciso, sensível, específico e com boa reprodutibilidade para a determinação da concentração do imunoc conjugado.

O método apresentou um curto intervalo entre o limite de detecção e quantificação, desfavorecendo amostras de concentrações muito baixas e muito altas. No entanto, ainda assim, mostrou-se preciso para determinação da concentração proteica do imunoc conjugado.

O método mostrou-se de extrema importância, pois utilizando-se a massa correta da proteína, a pureza radioquímica do radioimunoc conjugado foi superior a 95% em todos os estudos. No entanto, outros ensaios deverão ser realizados para que o método analítico possa ser validado de acordo com a RDC nº 27 de 17/05/2012 da ANVISA [13].

REFERÊNCIAS

- [1] R. Oliveira, D. Santos, D. Ferreira, P. M. B. Coelho, F. Veiga, Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **42**, pp. 151-165 (2006).
- [2] G.L. Denardo, V.V. Sysko, S.J. Denardo, Cure of incurable lymphoma. *Journal of Radiation Oncology Biology*, **66**, pp. S46-S56 (2006).
- [3] C.R.B.R. Dias, Estudo de Marcação dos Anticorpos Monoclonais IOR-CEA E IOR-EGF/R3 com ^{99m}Tc , *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares*, (2005).
- [4] C.R.B.R. Dias, Estudo Comparativo da Marcação do Anticorpo Anti-CD20 com ^{188}Re , *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares* (2010).
- [5] G. Barrio, C. R. B. R. Dias, J. A. O. Junior, Dosimetric studies of anti-CD20 labeled with therapeutic radionuclides at IPEN/CNEN-SP. *Scientia Plena*, **8** (2012).
- [6] R. A. Weinberg, *A biologia do câncer*, Artmed, Porto Alegre 2008.
- [7] “Rituximabe,” [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[34160-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[34160-1-0].PDF) (2013).
- [8] A. V. F. Massicano, Estudo da Conjugação e Radiomarcção do Anticorpo Monoclonal Rituximab para Aplicação em Terapia Radionuclídica, *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares* (2011).
- [9] M. Ribani, C. B. G. Bottoli, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, L. F. C. Melo, Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim. Nova*, **27** (2004).
- [10] M. C. Franck, Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica para Caracterização e Quantificação de Derivados Anfetaminícos, *Unicrsidade federal do Rio Grande do Sul* (2008).

[11] N. M. Kassab, L. G. R. Languê. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos por clae para determinação de midazolam em formulações farmacêuticas de uso humano e veterinário. *Departamento de Farmácia-Bioquímica da UFMS* (2009).

[12] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899 de 29/05/2003 "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos." Disponível em :
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect>> Acesso em: 07/08/2013.

[13] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 27 de 17/05/2012 “Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.” Disponível em :
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect>> Acesso em: 07/08/2013.