

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DESENVOLVIMENTO E EMPREGO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS
COMPLEMENTARES PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO MEDICAMENTO
CONSTITUÍDO PELO ANTICORPO MONOCLONAL BEVACIZUMABE (AVASTIN®)
FRACIONADO POR FARMÁCIAS DE MANIPULAÇÃO**

MICHELLE ADRIANE AMANTÉA DE FREITAS

Belo Horizonte - MG
2014

MICHELLE ADRIANE AMANTÉA DE FREITAS

**DESENVOLVIMENTO E EMPREGO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS
COMPLEMENTARES PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO MEDICAMENTO
CONSTITUÍDO PELO ANTICORPO MONOCLONAL BEVACIZUMABE (AVASTIN®)
FRACIONADO POR FARMÁCIAS DE MANIPULAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Armando Silva Cunha Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo

Belo Horizonte - MG
2014

F866d Freitas, Michelle Adriane Amantéa de.
Desenvolvimento e emprego de metodologias analíticas complementares para avaliação da estabilidade do medicamento constituído pelo anticorpo monoclonal bevacizumabe (Avastin®) fracionado por farmácias de manipulação / Michelle Adriane Amantéa de Freitas. – 2014.
100 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Armando da Silva Cunha Júnior.
Coorientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Medicamentos – Estabilidade – Teses. 2. Medicamentos – Administração – Teses. 3. Oftalmologia – Teses. 4. Olhos – Doenças – Teses. 5. Tratamento oftalmológico – Teses. 6. Anticorpos monoclonais – Teses. 7. Tecnologia farmacêutica – Teses. I. Cunha Júnior, Armando da Silva. II. Toledo, Vicente de Paulo C. P. de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD 615.4



FOLHA DE APROVAÇÃO

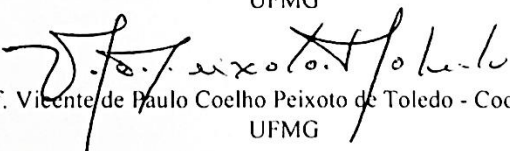
DESENVOLVIMENTO E EMPREGO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS
COMPLEMENTARES PARA AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO
MEDICAMENTO CONSTITUÍDO PELO ANTICORPO MONOCLONAL
BEVACIZUMABE (AVASTIN®) FRACIONADO POR FARMÁCIAS DE
MANIPULAÇÃO

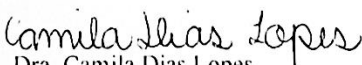
MICHELLE ADRIANE AMANTEA DE FREITAS

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 14 de abril de 2014, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Armando da Silva Canha Junior - Orientador
UFMG


Prof. Vicente de Paulo Coelho Peixoto de Toledo - Coorientador
UFMG


Dra. Camila Dias Lopes
UFMG


Dra. Marcia Helena Borges
FUNED

Belo Horizonte, 14 de abril de 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e avós que sempre apoiaram de forma incondicional minhas decisões e pretensões. Agradeço à minha mãe, Adriana, pelo inquestionável apoio emocional e financeiro e ao meu pai, Marciano, pelo constante incentivo e por compartilhar comigo o amor e o respeito pelo conhecimento e pela ciência. Aos meus queridos avós Leni e Mário que acima de tudo são meus grandes amigos e companheiros.

Agradeço ao meu noivo Adriano pelo companheirismo, pelo apoio nas decisões e pelo carinho que me fortaleceu durante o caminho e que me dá coragem para prosseguir em meus objetivos.

Ao professor Armando Cunha a quem muito admiro e a quem sou grata pela confiança, pelo respeito e por me acolher de forma tão carinhosa em seu grupo de pesquisa.

Agradeço de maneira especial ao professor Vicente Toledo que além de contribuir com seu conhecimento, espaço e recursos, enriqueceu meus dias com seu carinho e atenção. Ao procurar por um coorientador encontrei um verdadeiro amigo cuja amizade, sem dúvida alguma, se prolongará por longo período. Ao meu amigo, deixo minha verdadeira gratidão e manifesto minha admiração e respeito.

As doutoras Sílvia Ligório, Mariem Rodriguez e Tânia Mara por colaborarem com seus conhecimentos, espaços e recursos e por me acolherem carinhosamente em seus ambientes de trabalho.

A doutora Márcia Borges pelas sugestões, pela disponibilidade e por se mostrar sempre tão acolhedora.

A Marina, minha amiga e irmã de coração que me acompanha desde o início da graduação e que tanto me inspira através das suas atitudes determinadas, da seriedade com que assume os compromissos profissionais e da verdadeira inclinação à ciência e à pesquisa que demonstra. A você deixo minha gratidão pelo apoio e pela amizade de tantos anos e minha profunda admiração.

Aos meus queridos companheiros de laboratório Diego, Valquíria, Ana Luiza, Daniel, Condélia, Mariana, Liz, Helton, Sávia, Carol e Tamara pelos momentos de risadas e descontração, dentro e fora do laboratório, que tornam o dia a dia mais agradável.

Aos amigos do grupo de pesquisa, Lorena, Gabi, Marcela, Mayara, Mariany e Dani pelas sugestões, pelo companheirismo e pela amizade.

Aos meus queridos amigos da FUNED Liliane, Luciana, Pablo e Thomas pela acolhida em seus laboratórios, pelas conversas alegres e pela disponibilidade em ajudar sempre que preciso.

Aos amigos que me acompanham desde o início e que tanto amo, Stephanie, Jennifer e Fábio.

Ao Batista, funcionário da faculdade de farmácia, sempre tão solícito e disponível a nos ajudar.

RESUMO

O Avastin[®] (bevacizumabe) é um anticorpo monoclonal humanizado anti-VEGF aprovado para o tratamento de diferentes tipos de cânceres e utilizado de forma *off label* no tratamento de doenças oculares. Essa nova aplicação clínica do bevacizumabe associada à relação custo-benefício do medicamento gerou uma demanda pelo seu fracionamento em doses unitárias para atender às baixas doses utilizadas na administração intraocular. Diante disso, vários estudos têm sido conduzidos a fim de verificar a qualidade do medicamento após seu fracionamento. Para o estudo da qualidade do Avastin[®] fracionado pelas farmácias brasileiras, o serviço de fracionamento foi requisitado para 3 farmácias especializadas em manipulação de produtos estéreis, oftalmológicos ou de medicamentos especiais. Com base nas características particulares das proteínas, a qualidade do bevacizumabe fracionado foi investigada pela associação de técnicas cromatográficas, eletroforéticas, medidas turbidimétricas, análises de tamanho de partículas e ensaio imunoenzimático.

Por meio das metodologias adotadas, nenhuma instabilidade física ou química foi encontrada e a atividade biológica foi mantida nas frações de Avastin[®] adquiridas. Diferenças significativas foram encontradas entre os conteúdos das frações, observando-se volumes abaixo do rotulado em duas das três farmácias e volumes acima do rotulado em uma delas. No geral, pode-se sugerir que houve manutenção das propriedades físico-químicas das proteínas e da estabilidade da formulação após o fracionamento.

Palavras-chave: Avastin[®]; bevacizumabe; anticorpo monoclonal; oftalmologia; administração intravítrea; fracionamento; estabilidade.

ABSTRACT

Avastin[®](bevacizumab) is a humanized anti-VEGF monoclonal antibody approved as a first-line therapy for different types of cancer and used by intravitreal administration as off-label drug for the treatment of ocular diseases. This new clinical application of bevacizumab associated to the cost-benefit of the drug has generated a demand for its division into unit doses to meet the low doses used in intraocular administration. Thus, several studies have been conducted in order to verify the quality of repackaged bevacizumab. To study the quality of repackaged bevacizumab obtained from Brazilian suppliers we purchased the repackaged product from three external pharmacies specialized in ophthalmology, sterile or special compounding. Based on the complexity of the antibody structure, we investigated the quality of repackaged bevacizumab associating size-exclusion chromatography, polyacrylamide gel electrophoresis, turbidimetry, diffraction laser spectroscopy, nanoparticle tracking analysis and an enzyme-linked immunosorbent assay.

In general, there were no detectable differences in the physical–chemical properties between repackaged and reference bevacizumab. The only difference observed is the variation in the volume of the samples among the suppliers. This study suggests that if precautions are taken the formulation remains stable after compounding.

Key-words: Avastin[®], bevacizumab, monoclonal antibody, ophthalmology; intravitreal administration; repackaging, stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas que compõem o bulbo do olho.....	19
Figura 2 – Fotografias de fundo de olho de paciente (A) saudável e (B) portador de DMRI neovascular, demonstrando vasos sanguíneos imaturos e focos hemorrágicos na retina (adaptado de AMBATI & FOWLER, 2012).	20
Figura 3 – Representações esquemáticas da imunoglobulina IgG1 destacando os fragmentos Fab e Fc, as cadeias leves (L) e pesadas (H), os domínios variáveis (V) e constantes (C). Ligações dissulfeto (S-S) mantêm as quatro cadeias conectadas.....	24
Figura 4 – Representação de injeção intravítrea de fármacos para o tratamento local de doenças que acometem o segmento posterior do olho (adaptado de STEINBROOK, 2006).	25
Figura 5 - Modelo simplificado do mecanismo proposto para a agregação e associação de proteínas. Ag, agregados (Ag _s , solúveis e Ag _i , insolúveis); As, associados (As _s , solúveis e As _i , insolúveis); D, moléculas de proteína desnaturadas; N, moléculas de proteína no estado nativo.....	31
Figura 6 – Representação esquemática da faixa aproximada de tamanhos de partículas detectável por diferentes métodos analíticos (adaptado de ZOLLS <i>et al.</i> 2012).	32
Figura 7 – Esquema representativo de ELISA indireto (adaptado de Crowther, 2001).	37
Figura 8 – Frações recebidas de três farmácias (FM A-C).....	44
Figura 9 – Esquema representativo da avaliação da eficácia do BVZ por reação com seu ligante biológico.....	53
Figura 10 – Esquema de diluição do BVZ para uso em ensaio funcional.....	54
Figura 11 – Conteúdo das frações de Avastin [®] expresso como média (símbolos) e distância entre os volumes mínimos e máximos registrados (barra de erro); n=24.	57
Figura 12 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% (SDS-PAGE). (1) BVZ armazenado a 4 °C. Alíquotas aquecidas a (2) 40 °C por 3 horas, (3) 62 °C por 1 hora e (4) 62 °C por 2 horas. A amostra submetida à degradação térmica possui duas bandas extras de alto peso molecular, típicas de agregados proteicos. Gel corado com (A) Coomassie Blue e (B) solução de prata.	60
Figura 13 – Géis de poliacrilamida representando o perfil eletroforético do BVZ referência (R) e fracionado (FM A-C; n=9 para cada farmácia).....	61
Figura 14 – Varredura espectral do pico principal do BVZ.	62
Figura 15 – Perfil de eluição do BVZ (Avastin [®]) por CLAE.....	63
Figura 16 - Curvas de calibração obtidas na avaliação da linearidade.....	63
Figura 17 - Sobreposição dos cromatogramas representativos do BVZ controle e submetido a aquecimento. A) Região do cromatograma ampliada para melhor visualização dos picos de agregados proteicos.	65

Figura 18 - Superposição dos cromatogramas representativos do Avastin[®] referência e fracionado. A) Região ampliada para melhor visualização dos picos de agregados proteicos.	67
Figura 19 – Proporção do anticorpo nas formas de monômeros, oligômeros e agregados de alta massa molecular (M.M.) Avastin[®] referência e fracionado; n=15.	68
Figura 20 – Quantidade de monômeros nas amostras fracionadas em relação ao BVZ referência. Médias representadas pelo traço cheio; n= 15.	69
Figura 21 – Distribuição de tamanho do Avastin[®] (A) controle sem diluição, (B) controle diluído a 2,6 mg/mL e (C) submetido a aquecimento.	72
Figura 22 – Gráficos representativos da distribuição de tamanho por DLS (A) do Avastin[®] referência (B-D) amostras do fracionamento realizado, respectivamente, pelas farmácias A, B e C.	73
Figura 23 – Distribuição de tamanho de partículas e fotografias capturadas obtidas por NTA (A- B) BVZ controle e (C-D) BVZ aquecido por 5 minutos a 55 °C.	74
Figura 24 – Distribuição de tamanhos de partículas no Avastin[®] fracionado e referência por NTA	76
Figura 25 - Espectros de massa do BVZ (a) controle e (b) aquecido por 2 horas a 62 °C.	78
Figura 26 – Ensaio imunoenzimático empregando-se TMB e OPD como substratos enzimáticos e anticorpo conjugado a 0,02% (1:5.000).	79
Figura 27 – Ensaio imunoenzimático comparando o efeito do anticorpo conjugado nas concentrações 0,02% (1:5000), 0,025% (1:4000) e 0,030% (1:3000) empregando-se TMB como substrato.	80
Figura 28 - Ensaio imunoenzimáticos realizados em três dias consecutivos empregando-se BVZ em altas concentrações (9.760-1.250.000 ng/mL), anticorpo conjugado a 0,030% v/v (1:3000) e TMB como substrato. n=3 para cada ponto das curvas.	81
Figura 29 – A) Ensaio imunoenzimático realizado em concentrações baixas (6,25-100 ng/mL) e altas (9,75-125.000 ng/mL) de BVZ empregando-se, anticorpo conjugado a 0,03% v/v (1:3000) e TMB como substrato enzimático. B) Regressão linear realizada a partir dos pontos de maior concentração.	82
Figura 30 - Ensaio imunoenzimáticos realizados em dias consecutivos para avaliação da reprodutibilidade do método proposto. Empregou-se anticorpo conjugado a 0,03% v/v (1:3000) e TMB como substrato enzimático.	83
Figura 31 – (A) Ensaio imunoenzimático realizado em concentrações baixas (6,25-200 ng/mL) e altas (25-200.000 ng/mL) de BVZ comparando-se anticorpos conjugados a peroxidase de dois fornecedores. Emprego de anticorpo conjugado a 0,03% (1:3000) e TMB como substrato. (B) regressão não linear dos pontos da região de menor concentração.	84
Figura 32 – Ensaio imunoenzimático realizado em concentrações baixas (6,25-200 ng/mL) de BVZ, anticorpo conjugado a 0,03% (1:3000) e TMB como substrato.	85

Figura 33 - Ensaio imunoenzimático de BVZ em baixas concentrações (6,5 – 500 ng/mL) alterando-se, em relação aos ensaios anteriores, o fornecedor do VEGF. C) Teste empregando placa de outro lote. Ensaios realizados na mesma semana, empregando-se anticorpo conjugado a 0,03% (1:3.000) e TMB.	86
Figura 34 – Curva de calibração obtida no kit de ELISA Quantikine® e utilizada para quantificação do VEGF_{residual}.	89
Figura 35 – Atividade biológica do BVZ calculada como a eficiência de ligação do anticorpo ao VEGF₁₆₅ no Avastin® fracionado em relação ao referência; média ± DP. Farmácias A e C, n=4; Farmácia B, n=2.	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos encontrados na literatura sobre a qualidade e estabilidade do Avastin[®] fracionado. Métodos utilizados em cada estudo e parâmetros investigados.	28
Tabela 2 - Parâmetros cromatográficos utilizados para validação do método analítico e análise da estabilidade do bevacizumabe (Avastin[®]).....	47
Tabela 3 – Pesos e volumes mínimo, máximo, médio e desvio padrão registrados para as frações de Avastin[®]; n=24.	58
Tabela 4– Repetibilidade do método para quantificação de monômeros de BVZ por CLAE ...	64
Tabela 5 – Precisão intermediária do método de quantificação de monômeros do BVZ por CLAE.....	64
Tabela 6 -Estabilidade do bevacizumabe (Avastin[®]) em condições variadas.	66
Tabela 7 – Composição do Avastin[®] referência e fracionado por CLAE.....	67
Tabela 8 – Opalescência do BVZ controle e aquecido a 62 °C por 2 horas. A absorbância das soluções foi medida antes e após diluição.	70
Tabela 9 – Densidades óticas em 350 nm de amostras do Avastin[®] referência e fracionado; n=3.	71
Tabela 10 – Sumário dos resultados obtidos por DLS para o Avastin[®] referência e fracionado.	73
Tabela 11 – Tamanho Médio (nm) e o desvio padrão obtido por NTA; n=2	77
Tabela 12 – Parâmetros empregados por diferentes autores na análise da atividade biológica do BVZ por ELISA indireto.	88
Tabela 13 – Análise da estabilidade biológica de frações de bevacizumabe (Avastin[®]) fracionado em farmácias de manipulação. Concentrações médias de VEGF₁₆₅ e eficiência do bevacizumabe (Avastin[®]) em misturas BVZ-VEGF₁₆₅ após 3 horas de reação. O ensaio foi realizado em dois momentos diferentes, sendo o referência analisado conjuntamente com as amostras em cada um deles.	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BVZ	Bevacizumabe
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
DLS	Espalhamento da luz dinâmico(<i>dynamic light scattering</i>)
DMRI	Degeneração Macular Relacionada à Idade
ELISA	Ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EM	Espectrometria de massa
FDA	Food & Drug Administration
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
mAb	Anticorpo monoclonal (<i>monoclonal antibody</i>)
MALDI	Ionização/dessorção a laser assistida por matriz
NTA	Análise de Rastreamento de Nanopartículas (<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>)
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
REVISÃO DA LITERATURA	18
1. DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE	19
2. ANGIOGÊNESE	21
3. FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF)	21
4. AGENTES ANTI-VEGF	22
4.1. Bevacizumabe (Avastin®)	23
5. FRACIONAMENTO DO AVASTIN® PARA FINS TERAPÊUTICOS	25
7. INSTABILIDADES DOS ANTICORPOS	28
8. TECNICAS ANALÍTICAS PARA INVESTIGAÇÃO DE INSTABILIDADES EM FORMULAÇÕES PROTEICAS	31
8.1. Detecção, quantificação e distribuição de tamanho de agregados e partículas na formulação	33
8.2. Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)	34
8.3. Espectrometria de Massa	35
9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO BVZ (AVASTIN®)	36
9.1. Avaliação da eficácia do BVZ por ELISA indireto	37
9.2. Avaliação da eficácia do BVZ por reação com seu ligante biológico	38
OBJETIVOS	
1.1. Objetivo geral	40
1.2. Objetivos específicos	40
DESENVOLVIMENTO	
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1. Fracionamento do Avastin® em doses unitárias	43
2.2. Determinação do volume das frações	43
2.3. Indução de agregados e outras instabilidades na solução de BVZ (Avastin®)	45
2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	45

2.5. Cromatografia a Líquido de Alta eficiência por Exclusão de Tamanho (CLAE-ET)	47
2.6. Análise Turbidimétrica.....	49
2.7. Espalhamento da Luz Dinâmico (DLS).....	51
2.8. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	51
2.9. Espectrometria de Massa	52
2.10. Avaliação da eficácia do BVZ por reação com seu ligante biológico.....	53
2.11. Avaliação da eficácia do BVZ por ELISA indireto.....	55
3.RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.1. Determinação do volume das frações.....	56
3.2. Indução de agregados e outras instabilidades na solução de BVZ (Avastin®)	58
3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	58
3.4 Cromatografia a Líquido de Alta eficiência por Exclusão de Tamanho (CLAE-ET).....	62
3.4.1. Validação do método de análise do BVZ por CLAE	62
3.4.2 Análise cromatográfica do Avastin® para identificação de instabilidades.....	63
3.5. Análise turbidimétrica.....	69
3.6. Espalhamento da Luz Dinâmico (DLS).....	71
3.7. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	73
3.8. Espectrometria de Massa	77
3.9. Avaliação da eficácia do BVZ por ELISA indireto	78
3.10. Avaliação da eficácia do BVZ por reação com seu ligante biológico.....	89
3.DISCUSSÃO	92
4.CONCLUSÃO	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	98



INTRODUÇÃO

A Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) é uma doença decorrente da neovascularização ocular considerada a terceira maior causa de cegueira adquirida no mundo.

Dentre as opções terapêuticas existentes para seu controle, os inibidores da angiogênese representam um avanço, destacando-se a crescente prática de administrações intraoculares de bevacizumabe (Avastin[®], Roche).

O bevacizumabe (BVZ) é um anticorpo monoclonal recombinante que possui indicação aprovada para o tratamento de câncer colorretal, mamário, pulmonar, renal e epitelial e que vem sendo utilizado de forma *off label* no tratamento de doenças oculares em vários países, incluindo o Brasil.

A fim de obter maiores vantagens econômicas, tem sido comum na clínica médica o fracionamento do Avastin[®] em doses unitárias. No entanto, questões sobre a manutenção da estabilidade da proteína e da formulação após o fracionamento devem ser observadas.

Os anticorpos, como outras proteínas, são propensos a uma variedade de vias físicas e químicas de degradação que podem acarretar em perda ou redução da bioatividade, incremento da imogenicidade e formação de particulados que invalidem seu uso terapêutico.

Dessa forma, torna-se relevante a investigação de instabilidades decorrentes da manipulação, armazenamento e transporte envolvidos na prática de fracionamento do Avastin[®], o que exige a associação de metodologias analíticas complementares que permitam uma caracterização abrangente da formulação.

Por meio deste estudo, objetivamos avaliar a qualidade do Avastin[®] fracionado em farmácias de manipulação investigando instabilidades tipicamente observadas em formulações proteicas pela associação de técnicas cromatográficas (CLAE), eletroforéticas (SDS-PAGE), medidas turbidimétricas (UV-Vis), análise de tamanho de partículas (NTA) e ensaio imunoenzimático (ELISA).



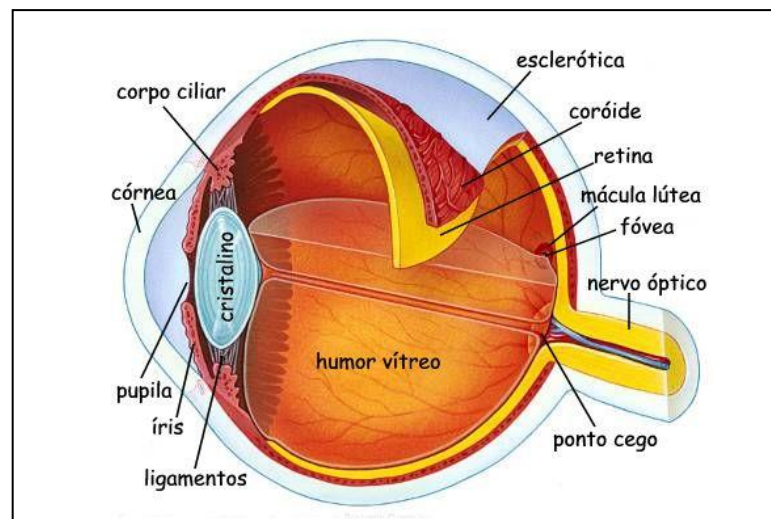
REVISÃO DA LITERATURA

1. DEGENERAÇÃO MACULAR RELACIONADA À IDADE

A Degeneração Macular Relacionada à Idade (DMRI) é uma doença ocular, ainda sem cura, caracterizada pelo dano ou falência da mácula (FERNÁNDEZ-ROBREDO *et al.*, 2014).

A mácula é uma área com cerca de 6 mm de diâmetro localizada na retina central (**Figura 1**). No centro da mácula encontra-se a fóvea, com 0,35 mm de diâmetro, que contém as células fotorreceptoras responsáveis pela visão a cores e distinção de detalhes. Quando há lesão na mácula, a região central das imagens é bloqueada, ocorrendo perda progressiva da visão (BRASIL, 2008).

Figura 1 – Estruturas que compõem o bulbo do olho.



A DMRI se encontra entre as dez doenças oculares consideradas prioritárias pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Segundo dados da OMS, a DMRI é responsável por 5% dos casos de perda de visão no mundo o que a torna a terceira maior causa de cegueira, após a catarata e o glaucoma. A prevalência da cegueira entre os indivíduos acometidos pela doença é de 8,7% (OMS, 2012).

Além da perda total da visão, a DMRI pode causar prejuízos na acuidade visual e se posiciona como a quarta maior causa mundial de deficiência visual após os erros de refração não corrigidos (miopia, hipermetropia e astigmatismo), a catarata e o glaucoma (OMS, 2012).

A prevalência da DMRI aumenta significativamente com a idade, afetando 2% da população abaixo de 40 anos e 25% dos indivíduos acima de 80 anos (FRIEDMAN *et al.*, 2004).

Dados do Censo Demográfico de 2010, realizado pelo IBGE, revelaram um aumento significativo da população brasileira com 65 anos ou mais, progredindo de 4,8% em 1991 a 5,9% em 2000 e atingindo 7,4% em 2010 (IBGE, 2010).

Sendo assim, o processo de transição demográfica vivenciada no mundo, especialmente nos países em desenvolvimento como o Brasil, indica uma tendência ao aumento na proporção de idosos e, conseqüentemente, na incidência de doenças relacionadas à idade, como a DMRI.

Há duas formas clínicas distintas de DMRI: a forma seca, ou não neo-vascular e a forma úmida, ou neovascular.

A forma neovascular é a mais grave e caracteriza-se pelo desenvolvimento de vasos sanguíneos imaturos (neovasos) entre as células do epitélio pigmentar da retina (EPR) e as células fotorreceptoras na retina central, culminando na formação da membrana neovascular coroidal (MNVC) (BRASIL, 2008).

Nesse processo conhecido como neo-vascularização coroidal (NVC), os vasos formados permitem o extravasamento de fluidos e sangue no espaço subretiniano causando edema na retina e danos às células fotorreceptoras (**Figura 2**)(AYOUB & PATEL, 2009; HUBSCHMAN *et al.*, 2009).

Figura 2 – Fotografias de fundo de olho de paciente (A) saudável e (B) portador de DMRI neovascular, demonstrando vasos sanguíneos imaturos e focos hemorrágicos na retina (adaptado de AMBATI & FOWLER, 2012).



2. ANGIOGÊNESE

Angiogênese é o processo de formação de novos vasos a partir de vasos pré-existentes que ocorre naturalmente no organismo durante o desenvolvimento embrionário, ciclo reprodutivo da mulher e em resposta à cicatrização de ferimentos para a restauração do fluxo sanguíneo nos tecidos lesados (DAMICO, 2007).

Em condições normais, as estruturas oculares são capazes de manter o equilíbrio entre os mediadores pró-angiogênicos e antiangiogênicos. Nas situações em que essa capacidade é perdida, a angiogênese pode se tornar insuficiente ou excessiva(DAMICO, 2007; HOSSEINI *et al.*, 2012).

Em 1971, Folkman sugeriu que o controle da angiogênese poderia ser útil na contenção do crescimento tumoral. Esse conceito de antiangiogênese foi aplicado a outras doenças e serviu como base para o estabelecimento de novas estratégias farmacológicas direcionadas às doenças neovasculares (FOLKMAN *et al.*, 1971; DAMICO, 2007).

3. FATOR DE CRESCIMENTO DO ENDOTÉLIO VASCULAR (VEGF)

Um dos fatores de crescimento mais bem estudados e um dos mais potentes fatores pró-angiogênicos é o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*)(SENGER *et al.*, 1993).

Pela ação direta sobre as células endoteliais, o VEGF desencadeia uma série de sinais reguladores positivos e negativos que resultam na promoção da angiogênese.

Apesar de ser um fator importante para a manutenção das funções oculares, a superprodução de VEGF é deletéria e níveis aumentados estão relacionados com a patogênese de doenças neovasculares ao induzir a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), aumentar a permeabilidade vascular e a resposta inflamatória(BRASIL, 2008; TOLENTINO *et al.*, 2011).

A família de fatores VEGF é constituída de no mínimo 5 membros, VEGF A, B, C, D e E, sendo a forma A a mais encontrada. Já foram identificadas quatro isoformas da molécula de VEGF A biologicamente ativas em seres humanos, às quais contêm

121, 165, 189 e 206 aminoácidos, e que desempenham papéis diferentes no processo de angiogênese. O VEGF₁₆₅ é a isoforma predominante no olho e existem evidências de que seja a responsável pela neovascularização patológica na retina (FERRARA, 2004; DAMICO, 2007).

4. AGENTES ANTI-VEGF

Uma vez que múltiplos estudos apontaram o envolvimento do VEGF na patogênese das doenças oculares neovasculares, a inibição desse fator tornou-se a principal estratégia para o controle da DMRI neovascular (HUBSCHMAN *et al.*, 2009; TOLENTINO *et al.*, 2011).

As atuais terapias antiangiogênicas baseiam-se na administração local de moléculas que se ligam ao VEGF impedindo a interação do fator com seus receptores na superfície endotelial e seus efeitos locais (Hubschman *et al.*, 2009).

Atualmente, três medicamentos são aprovados pelos órgãos regulatórios americano (FDA) e brasileiro (ANVISA) para administração intra-vítrea tratamento da DMRI: o Pegaptamibe (Macugen[®]), o ranibizumabe (Lucentis[®]) e o aflibercepte (Eylia[®], Bayer) (BRASIL, 2012; TOLENTINO *et al.*, 2011).

Em 2004 foi aprovado o uso intraocular do pegaptanibe sódico (Macugen[®], Pfizer), um aptâmero anti-VEGF, que possui a propriedade de bloqueio específico da atividade da isoforma 165 do fator de crescimento (BRASIL, 2008; PENN *et al.*, 2008).

Em 2006, os mesmos órgãos aprovaram o ranibizumabe (Lucentis[®], Roche), um fragmento de anticorpo anti-VEGF que inibe a ação de todas as suas isoformas.

Em 2012, a ANVISA aprovou o aflibercepte (Eylia[®], Bayer), uma proteína recombinante de fusão que se liga a todas as isoformas do VEGF, constituída pelos domínios extracelulares dos receptores 1 e 2 do VEGF fundidos ao fragmento cristalizável (Fc) do anticorpo humano (BRASIL, 2012; ESTADOS UNIDOS, 2011).

Desde 2005, o bevacizumabe (BVZ) vem sendo utilizado no Brasil e no mundo para o tratamento da DMRI neovascular por via intravítrea. Uma vez que sua aplicação

intraocular não está regulamentada no Brasil ou no exterior, seu emprego para tratamento da DMRI é classificado como *off label*. O uso de um medicamento é definido como *off label* quando difere das orientações da bula em relação à indicação terapêutica, dose, faixa etária, via de administração e/ou frequência de uso (BRASIL, 2008; BRASIL, 2012; ROCHE, 2013; TOLENTINO *et al.*, 2011).

Apesar do uso ocular do BVZ não ser regulamentado, é amplamente adotado pela classe médica e recomendado pelo Ministério da Saúde devido à boa relação custo-efetividade quando empregado no tratamento da DMRI neovascular.

Em 2011, a ANVISA publicou em seu site oficial um informe concluindo que o bevacizumabe e o ranibizumabe (medicamento regulamentado para o manejo da DMRI) podem ser considerados alternativas equivalentes em eficácia (BRASIL, 2011).

Em setembro de 2012 o Ministério da Saúde (MS) aprovou o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticos da Forma Neovascular da DMRI onde, baseado na literatura, considerou o bevacizumabe superior em custo-efetividade quando comparado ao ranibizumabe (BRASIL, 2012b).

Em novembro de 2012 o MS, por meio da portaria nº 48, tornou pública a decisão de não incorporar o medicamento ranibizumabe (Lucentis[®]) para DMRI no Sistema Único de Saúde (SUS), consolidando o uso *off label* do bevacizumabe (BRASIL, 2012c).

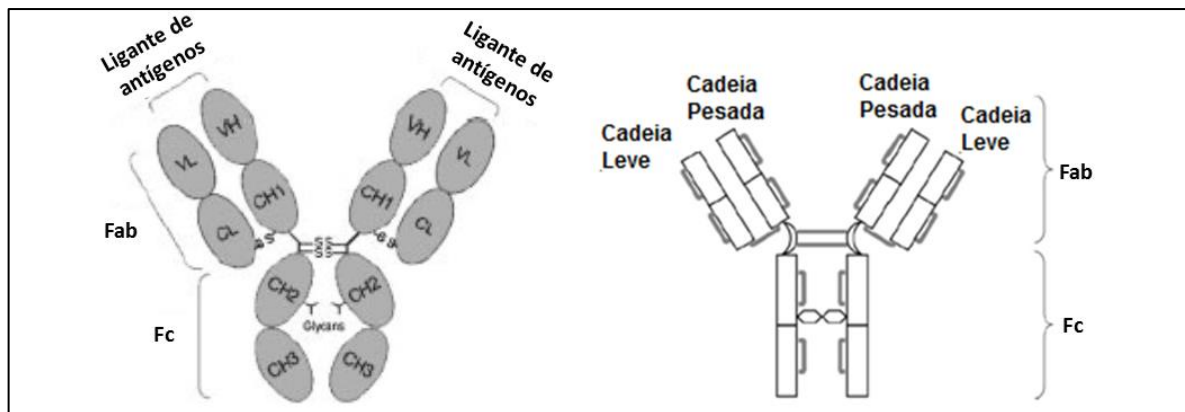
4.1. Bevacizumabe (Avastin[®])

O BVZ(Avastin[®]) é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante, do tipo IgG, indicado para o tratamento sistêmico de câncer colorretal, mamário, renal, pulmonar, uterino e epitelial cujo mecanismo de ação se baseia na sua ligação ao VEGF neutralizando seletivamente a atividade biológica de todas as isoformas do fator de crescimento endotelial (BRASIL, 2008; ROCHE, 2013; TOLENTINO *et al.*, 2011).

Anticorpos, também conhecidos como imunoglobulinas (Ig), são proteínas grandes em formato de Y, com peso molecular de aproximadamente 149 kDa, tipicamente

compostos por duas cadeias polipeptídicas pesadas (50 KDa) e duas cadeias polipeptídicas leves (25 Kda)(**Figura 3**). Interações não covalente e ligações dissulfeto unem as cadeias leves às pesadas. As cadeias pesadas permanecem unidas por duas ligações dissulfeto em uma região flexível denominada região de dobra (*hinge region*) (BARNES *et al.*, 2007; JANEWAY *et al.* 2001;ZHANG *et al.*, 2009).

Figura3 – Representações esquemáticas da imunoglobulina IgG1 destacando os fragmentos Fab e Fc, as cadeias leves (L) e pesadas (H), os domínios variáveis (V) e constantes (C). Ligações dissulfeto (S-S) mantêm as quatro cadeias conectadas (Adaptado de BARNES *et al.*; 2007 e ZHANG *et al.*; 2009).



Cada cadeia leve contém um domínio variável e um constante enquanto cada cadeia pesada consiste em um domínio variável e três constantes. As regiões variáveis das cadeias leves e pesadas de cada braço do Y geram dois sítios idênticos de ligação ao antígeno. As diferenças na sequência dos aminoácidos da região variável dos anticorpos conferem a especificidade da ligação ao antígeno (JANEWAY *et al.* 2001).

Existem cinco classes de anticorpos humanos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM os quais diferem entre si pela estrutura das suas regiões constantes. A digestão enzimática das moléculas de IgG pela papaína produz dois fragmentos ligantes de antígeno (Fab, *fragment antigen binding*) e um fragmento cristalizável (Fc, *Fragment crystallizable*). A maioria dos anticorpos possui apenas uma N-glicosilação nas regiões constantes de cada cadeia pesada (BARNES *et al.*, 2007; JANEWAY *et al.* 2001;ZHANG *et al.*, 2009).

5. FRACIONAMENTO DO AVASTIN® PARA FINS TERAPÊUTICOS

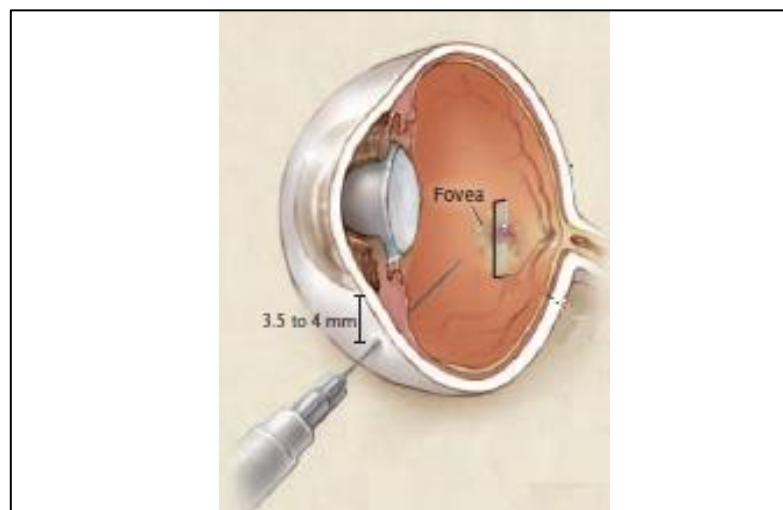
O BVZ (Avastin®) é disponível comercialmente sob a forma de solução para infusão intravenosa sem conservantes, apresentando pH em cerca de 6,2 e contendo, como excipientes da formulação, trealose, polissorbato 20 e os fosfatos de sódio monobásico e dibásico (BAKRI et al., 2006).

O Avastin® é comercializado em frascos-ampola de 4 ou 16 mL contendo, respectivamente, 100 e 400 mg do anticorpo monoclonal (25 mg/mL). De acordo com um levantamento realizado em 2013, o frasco-ampola contendo 100 mg de Avastin® é comercializado por cerca de R\$ 1.550,00.

A dose mais comumente usada para a injeção intravítrea (**Figura 4**) é de 1,25 mg, aplicada em média 3 vezes, com intervalo de 4 semanas entre as doses. Dessa forma, o frasco-ampola contendo 100 mg de Avastin® possui fármaco suficiente para a realização de 80 injeções intraoculares destinadas ao controle da DMRI (BRASIL, 2008).

No entanto, o Avastin® é fornecido como medicamento de dose única e, devido à ausência de conservantes na formulação e à suscetibilidade da proteína à degradação, considera-se na clínica médica que múltiplas perfurações e manipulações repetidas do frasco-ampola devem ser evitadas.

Figura 4 – Representação de injeção intravítrea de fármacos para o tratamento local de doenças que acometem o segmento posterior do olho (adaptado de STEINBROOK, 2006).



Dessa forma, a fim de se obter maiores vantagens econômicas sem comprometer a qualidade do medicamento, tem sido prática na clínica médica o fracionamento do Avastin[®] em doses unitárias contendo alíquotas reduzidas do anticorpo monoclonal (BRASIL, 2008).

A evidente vantagem econômica da aquisição de doses unitárias contendo pequeno volume de Avastin[®] aliada ao estabelecimento desse medicamento como primeira linha no controle da DMRI favorece a prática do fracionamento por farmácias hospitalares e de manipulação. No entanto, questões sobre a manutenção da estabilidade da proteína e esterilidade após fracionamento devem ser observadas.

O fabricante declara que, a fim de garantir a estabilidade do anticorpo, o frasco-ampola de Avastin[®] deve ser mantido sob refrigeração entre 2 e 8 °C, protegido da luz e armazenado na embalagem secundária original até o tempo de uso, evitando-se congelamento e agitação. No entanto, durante o fracionamento do medicamento o anticorpo monoclonal pode ser submetido a condições fora das preconizadas.

Como toda proteína, os anticorpos monoclonais são susceptíveis a processos de degradação que resultem em modificações estruturais e funcionais. As instabilidades geradas podem comprometer a eficácia e a segurança da terapia devido à redução da atividade e potenciais efeitos adversos desencadeados pelos produtos de degradação. Por exemplo, vários casos de endoftalmite severa têm sido descritos após a injeção intraocular do fármaco fracionado (SATO *et al.* 2010; ZHANG *et al.* 2009).

Outro fato relevante diz respeito aos casos de pressão intraocular elevada observada em pacientes após administração intravítrea de Avastin[®] que, segundo Kahook *et al.* (2010), tem como potencial causa a presença de agregados do anticorpo em solução.

Diante disto, vários estudos têm sido conduzidos a fim de verificar a estabilidade, esterilidade e manutenção da atividade biológica do medicamento após seu fracionamento.

6. ESTABILIDADE DO BVZ (AVASTIN[®]) FRACIONADO

Em termos gerais, estabilidade é a propriedade do fármaco de manter suas características físicas, químicas, microbiológicas e biológicas dentro dos limites especificados (BARDIN *et al.*, 2012).

Vem sendo estudada em diversos países a qualidade do Avastin[®] fracionado e submetido a condições variadas associadas ao uso clínico do medicamento. As técnicas e métodos analíticos empregados se diferenciam entre os estudos e, conseqüentemente, as instabilidades investigadas variam de acordo com a instrumentação e metodologia utilizadas (**Tabela 1**).

Nos EUA, Kahook *et al.* (2010) empregaram CLAE-ET, eletroforese e imagem sob microfluxo (MIF) para investigarem a presença de agregados e partículas no Avastin[®] fracionado e acondicionado em seringas.

No Reino Unido, Palmer *et al.*(2013) compararam amostras de Avastin[®] fracionado em seringas plásticas com o medicamento mantido no seu frasco-ampola original. Por meio das técnicas listadas na **Tabela 1**, os autores avaliaram as partículas subvisíveis em termos de distribuição de tamanho, densidade e tamanho molecular, definiram o conteúdo de imunoglobulinas, a concentração proteica total e o perfil eletroforético das amostras.

Wan *et al.* (2012) utilizaram EM para identificar modificações estruturais do BVZ obtido comercialmente para posterior correlação com efeitos adversos do medicamento.

Utilizando meio de cultura, espectrometria de massa e ensaio imunoenzimático, Chen *et al.* (2009) avaliaram a esterilidade, estabilidade e eficácia do Avastin[®] em frascos-ampola armazenado a 4 °C e submetido à amostragem periódica durante 6 meses.

Por meio de ensaio imunoenzimático, Bakri *et al.*(2006) avaliaram a atividade biológica de amostras de BVZ armazenadas por até 6 meses em seringas de polipropileno e detectaram degradação máxima de 15,9%.

No Brasil ainda não foram publicados estudos direcionados à avaliação da qualidade do Avastin[®] fracionado e, portanto, não existem informações sobre os riscos associados à prática de fracionamento pelas farmácias brasileiras.

Tabela 1 – Estudos encontrados na literatura sobre a qualidade e estabilidade do Avastin[®] fracionado. Métodos utilizados em cada estudo e parâmetros investigados.

Referência	Métodos	Parâmetros investigados
PALMER <i>et al.</i> , 2013	CLAE-ET ELISA MFI Proteínas Totais SDS-PAGE	Distribuição de tamanho e quantificação das partículas subvisíveis e visíveis; perfil eletroforético; quantificação dos anticorpos e das proteínas totais.
PAUL <i>et al.</i> , 2012	CLAE-ET CLAE-TC DLS UV-Vis UV-Vis – 2 ^a derivada Microscopia Digestão enzimática/CLAE-FR	Distribuição de tamanho e quantificação de partículas subvisíveis e visíveis; inspeção de partículas visíveis por microscopia e análise turbidimétrica; alterações proteicas estruturais por espectroscopia no UV-Vis e mapeamento peptídico.
LIU <i>et al.</i> , 2011	CLAE-ET MFI	Distribuição de tamanho e quantificação das partículas subvisíveis e visíveis.
KAHOOK <i>et al.</i> , 2011	CLAE-ET MFI ELISA Proteínas Totais SDS-PAGE	Distribuição de tamanho e quantificação de partículas subvisíveis e visíveis; perfil eletroforético; quantificação dos anticorpos e das proteínas totais.
CHEN <i>et al.</i> , 2009	ELISA EM (MALDI-TOF) Cultura	Atividade biológica (eficácia de ligação do BVZ ao VEGF); esterilidade; alterações estruturais por EM.
BAKIRI <i>et al.</i> , 2006	ELISA	Atividade biológica (eficácia de ligação do BVZ ao VEGF);

CLAE-ET = Cromatografia a líquido de alta eficiência por exclusão de tamanho; CLAE-FR = Cromatografia a líquido de alta eficiência em fase reversa; CLAE-TC = cromatografia a líquido de alta eficiência de troca catiônica; DLS = Espalhamento da luz dinâmico; ELISA = Ensaio imunoenzimático; EM (MALDI-TOF) = Espectroscopia de massa com ionização-dessorção à laser assistida por matrix; MFI = Imagem sob microfluxo (*Microflow Imaging*); SDS-PAGE = Eletroforese em gel de poliacrilamida.

7. INSTABILIDADES DOS ANTICORPOS

Apesar de, em geral, serem mais estáveis que as demais proteínas, os anticorpos são propensos a múltiplos mecanismos de degradação os quais podem ser divididos em duas principais categorias: instabilidades físicas e químicas (WANG *et al.*, 2005).

As instabilidades químicas referem-se às alterações na estrutura primária da proteína sendo mais comumente descritas as reações de desaminação, oxidação, fragmentação, isomerização e as ligações cruzadas. Dependendo da região em que as modificações químicas ocorrem, a atividade proteica pode ou não ser afetada (WANG *et al.*, 2007).

Reações físicas de instabilidade envolvem alterações na estrutura secundária ou terciária da proteína e incluem desnaturação proteica, agregação, precipitação e adsorção a superfícies (CAPELLE *et al.*, 2007; MAHLER *et al.*, 2005).

Os fatores que podem afetar a estabilidade da proteína durante a produção, armazenamento, transporte e manuseio incluem temperatura (exposição ao calor e ciclos de congelamento-descongelamento), condições da solução (como pH, adição de co-solventes, surfactantes ou estabilizadores) e interações com superfícies (MAHLER *et al.*, 2005).

7.1. Agregados proteicos e partículas

A agregação constitui a principal via de degradação física encontrada em formulações proteicas líquidas e pode implicar em perda de atividade e toxicidade. Agregados são definidos como associados de proteínas que variam em tamanho, estrutura e reversibilidade (MAHLER *et al.*, 2005; ZOLLS *et al.*, 2012).

Em geral, de acordo com suas características, os agregados proteicos podem ser classificados como (CROMWELL *et al.*, 2006):

- solúveis ou insolúveis;
- reversíveis ou irreversíveis;
- covalentes ou não covalentes;
- nativos ou desnaturados.

Em termos de tamanho, podem variar de dímeros na escala nanométrica até grandes agregados com centenas de micrometros, os quais são visíveis ao olho nu. Agregados de grande tamanho, acima de 0,1 μm , são denominados partículas. De acordo com a corrente classificação, as partículas podem ser classificadas como

submicrométricas (0,1 - 1 μm), subvisíveis (0,1 - 100 μm) e visíveis (acima de 100 μm) (ZOLLS *et al.*, 2012).

Para proteínas de uso terapêutico, a presença de agregados e particulados é tipicamente considerada indesejável visto que podem desencadear reações imunológicas ou eventos adversos após a administração (CROMWELL *et al.*, 2006).

Além das partículas proteicas, partículas não-proteicas de diversas origens, como do material de embalagem, podem afetar a qualidade do produto e também devem ser investigadas (ZOLLS *et al.*, 2012).

A relação entre agregados proteicos e reações imunológicas desencadeadas no paciente após a administração de proteínas terapêuticas é amplamente descrita na literatura. Sabe-se que proteínas no estado agregado são mais facilmente reconhecidas pelo sistema imunológico do que em seu estado nativo. Além dos efeitos imunoalergênicos clássicos, a resposta imunológica desencadeada pode acarretar em perda de atividade biológica do biofármaco uma vez que o organismo passa a produzir anticorpos neutralizantes contra as proteínas que integram os agregados fortemente antigênicos (BARDIN *et al.*, 2012; ENGELSMAN *et al.*, 2011).

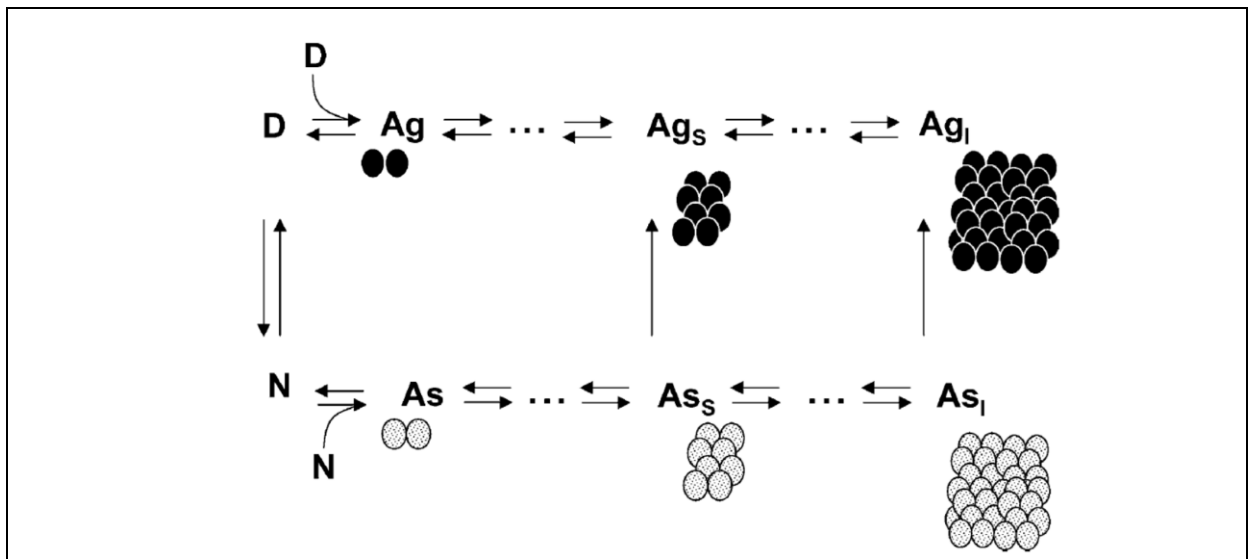
Particulados também são indesejáveis em medicamentos de administração intravítrea devido à possibilidade de obstrução do sistema trabecular e comprometimento da drenagem do humor aquoso com consequente elevação da pressão intraocular (KAHOOK *et al.*, 2011)

A agregação pode ocorrer por variados mecanismos sendo dependente das condições de estresse e do estado inicial da proteína. O processo de agregação pode se iniciar a partir da proteína em sua estrutura nativa ou modificada (parcialmente ou inteiramente desdobrada) (**Figura 5**). Os agregados formados nesse processo podem ser solúveis ou insolúveis culminando em formação de precipitados (CROMWELL *et al.*, 2006; MAHLER *et al.*, 2009).

Os agregados podem ser formados por interações fracas, como de Van de Waals, de hidrogênio, eletrostáticas ou hidrofóbicas (agregados não-covalentes) ou pela formação de ligações fortes, do tipo dissulfeto, a partir de grupos tióis livres (agregados covalentes) (MAHLER *et al.*, 2009).

Mahler *et al.* (2005) destacam que existe competição entre o estado agregado das proteínas e sua estrutura nativa, caracterizando uma reversibilidade do estado agregado (**Figura 5**).

Figura 5- Modelo simplificado do mecanismo proposto para a agregação e associação de proteínas. Ag, agregados (Ag_s , solúveis e Ag_i , insolúveis); As, associados (As_s , solúveis e As_i , insolúveis); D, moléculas de proteína desnaturadas; N, moléculas de proteína no estado nativo (MAHLER *et al.*, 2005).



8. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA INVESTIGAÇÃO DE INSTABILIDADES EM FORMULAÇÕES PROTEICAS

O número de métodos aplicados para caracterização e quantificação de instabilidades proteicas tem aumentado continuamente nos últimos anos. No entanto, para uma caracterização mais ampla, é necessário associar diversas técnicas analíticas, as quais fornecem diferentes princípios de análise (ZOLLSet *al.*, 2012).

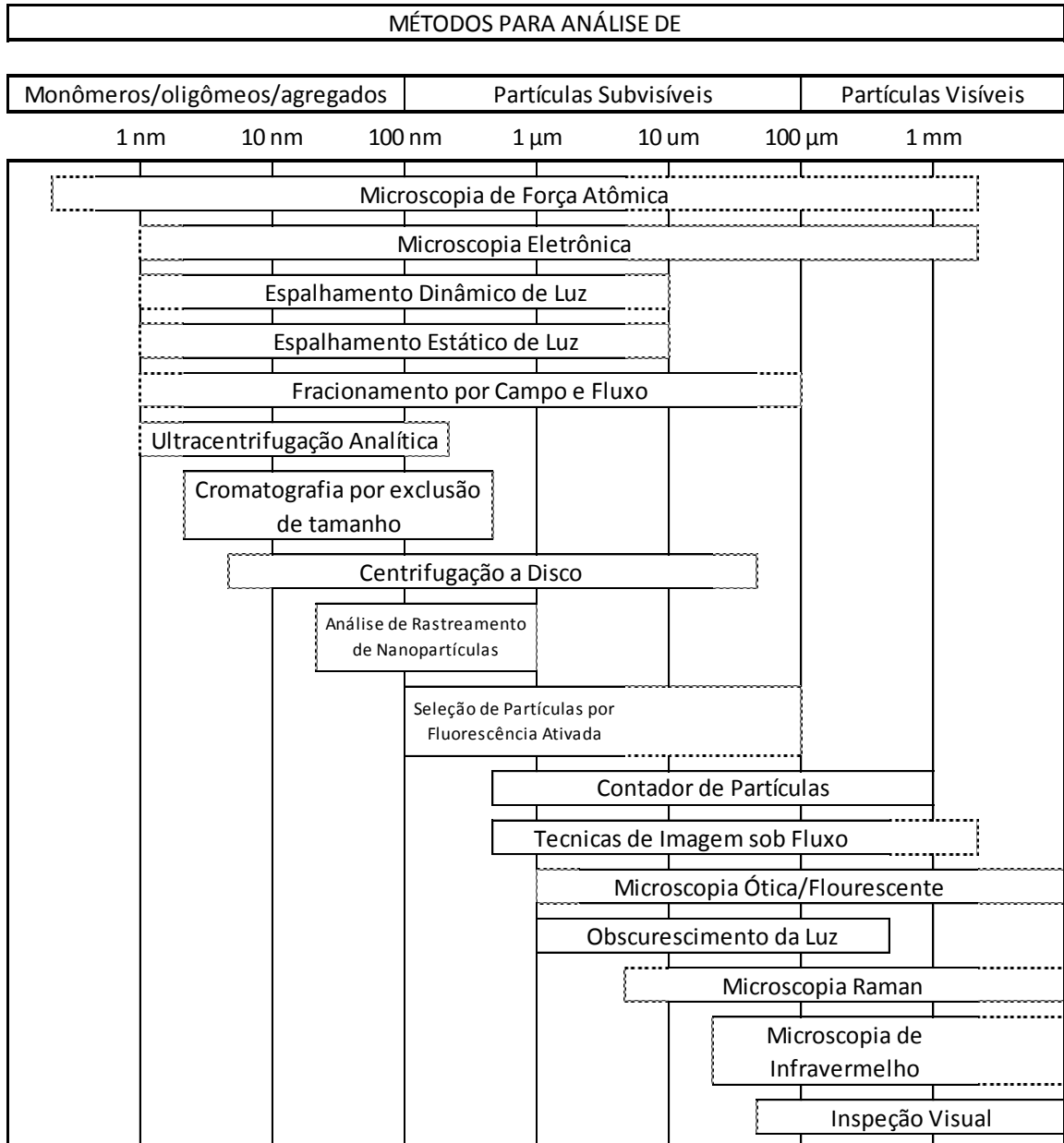
Apesar de vários autores concordarem que é necessário associar metodologias analíticas complementares para um estudo completo da estabilidade de proteínas de uso terapêutico, não há um guia de recomendações disponível para orientação dos estudos (BARDINet *al.*, 2012).

A caracterização dos produtos da degradação química, como a desaminação, são frequentemente detectados por técnicas eletroforéticas, como a focalização

isoelétrica, por cromatografia a líquido de troca iônica e por espectrometria de massa (STAUB *et al.*, 2011).

Uma vez que no processo de agregação são gerados agregados na faixa de oligômeros até grandes agregados insolúveis na faixa micrométrica, é comumente descrita na literatura a associação de métodos analíticos complementares com diferentes faixas de detecção capazes de detectar agregados e partículas de vários tamanhos (**Figura 6**).

Figura 6 – Representação esquemática da faixa aproximada de tamanhos de partículas detectável por diferentes métodos analíticos (adaptado de ZOLLSE *et al.* 2012).



8.1. Detecção, quantificação e distribuição de tamanho de agregados e partículas na formulação

Para determinação da distribuição de tamanho das moléculas e partículas na formulação, várias técnicas analíticas são empregadas diferenciando-se entre si em relação à faixa de tamanhos analisada (**Figura 6**).

Para interpretação dos resultados, é importante considerar que, em muitos casos, dois métodos não fornecerão o mesmo resultado para determinado parâmetro estudado.

O espalhamento da luz dinâmico (DLS, do inglês *dynamic light scattering*) e a Análise de Rastreamento de Nanopartículas (NTA, do inglês *Nanoparticle Tracking Analysis*) constituem técnicas que relacionam o movimento Browniano ao tamanho da partícula fornecendo o perfil de distribuição de tamanho das moléculas em solução. Ambos são aplicados para detecção de agregados proteicos na faixa de nanômetros que se formam no início do processo de agregação (MAHLER *et al.*, 2005).

No DLS, o movimento browniano das partículas gera flutuações na intensidade da luz desviada. Por análise matemática, tais flutuações são associadas à velocidade do movimento browniano e ao tamanho hidrodinâmico das partículas. Uma vez que a intensidade da luz desviada é proporcional à 6ª potência do diâmetro da partícula, a técnica é muito sensível à presença de pequenas quantidades de partículas de grande tamanho. Dependendo dos objetivos da análise e do tipo de amostra, essa característica do DLS pode constituir uma fonte de imprecisão ou apresentar-se como vantagem ao favorecer a investigação de contaminações com partículas de maior tamanho em nível de traço na amostra (FILIFE *et al.*, 2010).

O NTA possui a vantagem de ser apropriado para análise de amostras polidispersas, como é o caso da maior parte das formulações proteicas. Como inconveniente, destaca-se que a qualidade dos vídeos capturados e a repetitividade da análise requerem um operador treinado para o ajuste adequado do instrumento e definição dos parâmetros da análise.

A Espectrometria na região do UV/Vis é empregada para investigação de partículas e agregados visíveis e insolúveis pelo método turbidimétrico. Nele, a densidade óptica da amostra é avaliada com base na dispersão da luz nas regiões do visível ou UV-próximo, nas quais as proteínas têm absorção desprezível. A presença de partículas em suspensão, como agregados proteicos insolúveis em água e precipitados, leva a um aumento aparente da absorbância no UV em todos os comprimentos de onda, devido a efeitos de espalhamento da luz(MAHLER *et al.*, 2005; PAUL *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2005).

8.2. Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia a líquido é considerada uma ferramenta indispensável na análise de proteínas devido ao reduzido tempo de análise e à alta precisão dos resultados.

Existem cinco diferentes tipos de cromatografia a líquido que podem ser empregadas na análise de proteínas (STAUB *et al.*, 2011):

- cromatografia a líquido de fase reversa;
- de troca iônica;
- por afinidade;
- por exclusão de tamanho e
- de interação hidrofílica.

A cromatografia a líquido de fase reversa apresenta inconvenientes na análise de proteínas intactas sendo observados múltiplos picos no cromatograma, baixa performance cromatográfica e baixa retenção da proteína a qual, devido à sua elevada massa molecular, é rapidamente excluída da coluna sem interação adequada com a fase estacionária. Apesar de não ser útil na análise do anticorpo íntegro, cromatografia de fase reversa é empregada em mapeamentos peptídicos, sendo requeridas clivagens enzimáticas prévias da proteína(PAUL *et al.*, 2012; STAUB *et al.*, 2011).

A cromatografia de troca iônica é indicada para determinação de desaminação proteica (STAUB *et al.*, 2011).

A cromatografia por afinidade se baseia em interações entre a proteína de interesse e ligantes imobilizados na fase estacionária. Para o estudo de anticorpos, existem colunas de alta afinidade por imunoglobulinas comercialmente disponíveis para quantificação e purificação da biomolécula.

A cromatografia a líquido por exclusão de tamanho (SEC, do inglês *size-exclusion chromatography*) é considerada o método de escolha para a identificação e caracterização de agregados uma vez que permite uma separação seletiva e rápida das macromoléculas com base na sua forma e tamanho (raio hidrodinâmico) em um intervalo de massa molecular entre 5 e 1000 kDa (Goetz *et al.*, 2004; Mahler *et al.*, 2009; Staub *et al.*, 2011).

Dentre os métodos cromatográficos, a cromatografia por exclusão de tamanho possui a vantagem de dispensar o uso de solventes orgânicos, evitando a desnaturação da proteína de interesse ou dissociação dos agregados (ENGELSMAN *et al.*, 2011).

8.3. Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa (EM) é considerada uma técnica indispensável para a caracterização de anticorpos monoclonais (mAb), pois modificações estruturais resultantes de degradação ou heterogeneidade geram diferenças na massa molecular da proteína (LIU *et al.*, 2009).

Zhang *et al.* (2009), sumariza as técnicas baseadas em EM para caracterização de mAb em:

- **Determinação da massa do mAb intacto:** a qual fornece uma representação geral da proteína, sem informações estruturais detalhadas.
- **Caracterização estrutural *Middle-up*:** análise espectrométrica de fragmentos do mAb gerados por redução das ligações dissulfeto ou digestão proteica limitada.
- **Caracterização estrutural *Bottom up*:** digestão da proteína em pequenos peptídeos para caracterização da modificação em nível de resíduo.

Dentre as técnicas listadas, as caracterizações *middle-up* e *bottom up* são, em geral, reservadas aos estudos de caracterização dos anticorpos nas etapas iniciais da pesquisa e do desenvolvimento da biomolécula.

Devido à maior praticidade, é descrita na literatura a determinação da massa do mAb intacto na investigação de instabilidades em formulações contendo anticorpos. Alexander *et al.* (1995) adotaram a EM com dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI/MS) para caracterizar a degradação de anticorpos em estudo de estabilidade acelerado. Chen *et al.* (2009) também adotaram a MALDI-MS para avaliação da estabilidade de BVZ armazenado em frasco-ampola, a 4 °C e submetido à amostragem periódica durante 6 meses.

9. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO BVZ (AVASTIN[®])

Devido à estrutura particular das proteínas e da sua relação estrutura tridimensional/atividade, a avaliação da atividade biológica é recomendada como um teste final nos estudos de estabilidade de proteínas terapêuticas (BARDIN *et al.*, 2012).

Na pesquisa de anticorpos, a atividade biológica pode ser avaliada por meio de um ensaio simples de ligação entre o anticorpo e seu antígeno, por teste de potência em um modelo biológico celular ou por ensaio em modelo animal (BARDIN *et al.*, 2012; FLATMAN *et al.*, 2007).

Ensaio de ligação representam um método robusto e preciso para determinação da eficácia de anticorpos. Neles, a atividade biológica pode ser determinada mensurando a quantidade do anticorpo que se liga com seu antígeno e comparando com um padrão de referência. Para os ensaios de ligação, é amplamente descrito na literatura a utilização de ensaios imunoenzimáticos como o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

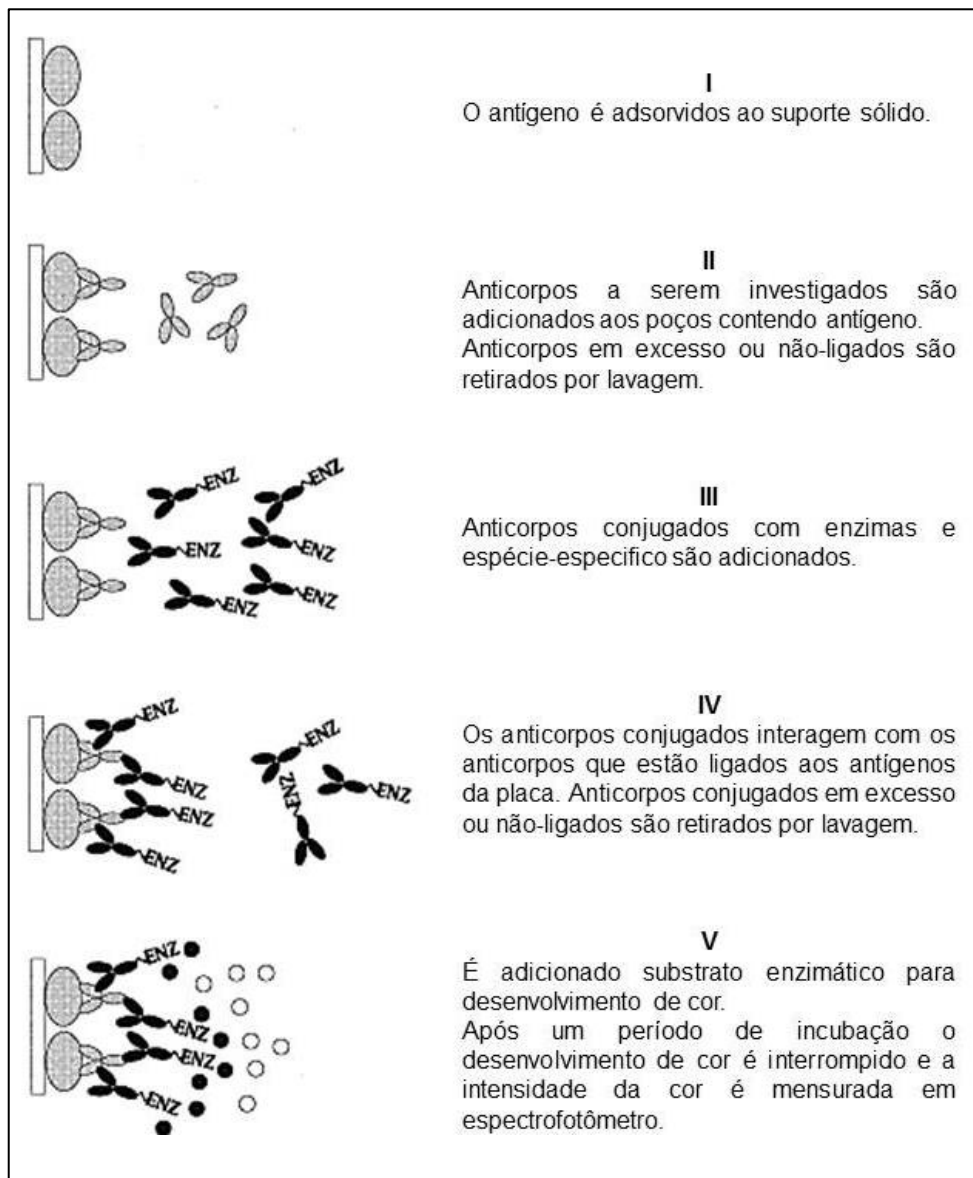
Para quantificação e avaliação da atividade ligante (eficácia) do BVZ (Avastin[®]), são descritas na literatura duas técnicas analíticas que envolvem a ligação do anticorpo ao seu ligante biológico.

9.1. Avaliação da eficácia do BVZ por ELISA indireto

O ELISA do tipo indireto é um ensaio amplamente utilizado para a detecção e/ou quantificação de anticorpos.

Utilizado na prática clínica para fins diagnósticos, o ensaio se baseia na interação entre o anticorpo de interesse e seu antígeno previamente aderido a um suporte sólido. A especificidade dessa prova é garantida principalmente pela qualidade do antígeno adsorvido à placa. As etapas do ELISA indireto são ilustradas e resumidas na **Figura 7** (CROWTHER, 2000).

Figura 7 – Esquema representativo de ELISA indireto(adaptado de Crowther, 2001).



ELISA do tipo indireto é amplamente empregado para quantificação e/ou análise da atividade ligante do BVZ. Em geral, o ensaio consiste no revestimento das placas com VEGF₁₆₅, adição das amostras contendo BVZ e posterior detecção com anticorpo anti-IgG humano conjugado a enzima.

Bock *et al.* (2007) utilizaram a metodologia para analisar e comparar a atividade ligante do BVZ ao VEGF₁₆₅ humano e murino.

Bakiri *et al.* (2006) aplicaram o ELISA indireto para quantificar o BVZ em amostras de Avastin[®] e determinar a degradação do fármaco durante o armazenamento.

Olsen *et al.*, 2011; Sinapis *et al.*, 2011; Ternant *et al.*, 2010 e diversos outros autores empregaram ELISA indireto utilizando VEGF₁₆₅ como antígeno de captura para quantificação do BVZ em matrizes biológicas durante estudos farmacocinéticos.

9.2. Avaliação da eficácia do BVZ por reação com seu ligante biológico

Outra metodologia para avaliação da eficácia do BVZ (Avastin[®]) foi descrita por Chen *et al.* (2009).

Com o objetivo de estudar o impacto de diferentes períodos e condições de armazenamento sobre a atividade biológica do BVZ, os autores promoveram a reação entre o anticorpo e seu ligante biológico, o VEGF₁₆₅, e quantificaram o VEGF consumido durante a reação.

$$\text{VEGF}_{\text{Consumido}} = \text{VEGF}_{\text{Inicial}} - \text{VEGF}_{\text{Final (quantificado)}} \quad (1)$$

A análise de eficácia de anticorpos por reação prévia com seu antígeno biológico seguida de quantificação do antígeno residual foi posteriormente aplicada por Ikeda *et al.* (2012) no estudo da estabilidade do anticorpo monoclonal infliximabe.



OBJETIVOS

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Selecionar, adaptar e avaliar metodologias analíticas complementares para o estudo da estabilidade do anticorpo monoclonal bevacizumabe (Avastin[®]) e empregá-las para avaliar a qualidade e a estabilidade do medicamento fracionado em doses unitárias por farmácias que prestam o serviço de fracionamento a oftalmologistas brasileiros.

1.2. Objetivos específicos

- a. Definir e aperfeiçoar os métodos analíticos para avaliação da estabilidade do Avastin[®];
- b. validar um método cromatográfico para quantificação de anticorpos na sua forma monomérica;
- c. comparar a quantidade de BVZ na sua forma monomérica no Avastin[®] fracionado e referência e estimar possíveis perdas da forma monomérica por degradação.
- d. comparar o perfil cromatográfico do Avastin[®] fracionado e referência investigando a presença de agregados proteicos e fragmentos por meio de CLAE por exclusão de tamanho;
- e. empregar eletroforese em gel de poliacrilamida para comparar o perfil eletroforético do Avastin[®] fracionado e referência investigando agregados e fragmentos proteicos;
- f. investigar a contaminação do Avastin[®] fracionado com partículas visíveis proteicas e não proteicas por meio de espectroscopia no UV-visível.
- g. Empregar técnicas de Análise de Rastreamento de Partículas (NTA) e Desvio Dinâmico da Luz (DLS) para comparar o tamanho médio e a distribuição de tamanho das partículas no Avastin[®] referência e fracionado;
- h. propor e aplicar um método imunoenzimático para avaliar a atividade biológica do BVZ no medicamento referência e fracionado.



DESENVOLVIMENTO

1. INTRODUÇÃO

Com base nas características particulares das proteínas e buscando realizar um estudo abrangente e criterioso, selecionamos um conjunto de métodos analíticos complementares capazes de avaliar a manutenção da estabilidade física, química e biológica do BVZ (Avastin[®]) após o fracionamento.

Os métodos selecionados foram adaptados de acordo com a disponibilidade de equipamentos e recursos. Uma vez que o fracionamento do Avastin[®] em doses unitárias gera alíquotas de pequeno volume (cerca de 150 µL), buscou-se adaptar as metodologias de forma a minimizar o volume de amostra e diluições requeridas para a análise.

Para avaliarmos o caráter indicador de estabilidade de cada método analítico selecionado, instabilidades físico-químicas foram induzidas em amostras de Avastin[®] para posteriores análises e comparações com amostras controle. Temperaturas acima da recomendada pelo fabricante, agitação e alterações no pH são consideradas os principais fatores indutores de degradação nas formulações proteicas. Uma vez que o pequeno volume do medicamento (4mL/ampola) dificulta alterações e controle do pH, buscou-se induzir as instabilidades aplicando-se perturbações térmica ou mecânica sobre alíquotas de Avastin[®]. Assim, após triagem inicial, o aquecimento foi considerado a condição mais eficiente para indução de instabilidades na formulação proteica.

As metodologias selecionadas foram consideradas indicadoras de estabilidade e apropriadas para a investigação de instabilidades nas frações de Avastin[®] quando forneceram resultados distintos entre as soluções de BVZ controle e submetida a estresse térmico.

Após definição das metodologias adequadas ao nosso estudo, o fracionamento do Avastin[®] em doses unitárias foi requisitado para três farmácias especializadas em manipulação de produtos estéreis, oftalmológicos ou de medicamentos especiais.

Com base nas características particulares das proteínas, a qualidade do medicamento fracionado foi investigada pela associação de técnicas

cromatográficas, eletroforéticas, medidas turbidimétricas, análises de tamanho de partículas e ensaio imunoenzimático.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Fracionamento do Avastin[®] em doses unitárias

Para o estudo da qualidade do Avastin[®] fracionado pelas farmácias brasileiras, o serviço de fracionamento foi requisitado para três farmácias especializadas em manipulação de produtos estéreis, oftalmológicos ou de medicamentos especiais. Para exposição dos resultados, as farmácias e suas frações foram identificadas como FM A, B e C.

Mantendo-se sigilo sobre o estudo, requisitou-se de cada farmácia o fracionamento de 4 frascos de Avastin[®] contendo 4 mL em doses unitárias de 0,15 mL. A requisição foi realizada duas vezes para cada farmácia totalizando dois lotes de fracionamento.

Bevacizumabe (Avastin[®], Roche) recentemente adquirido e mantido em seu frasco original (100 mg/4mL) foi usado como referência para as análises.

2.2. Determinação do volume das frações

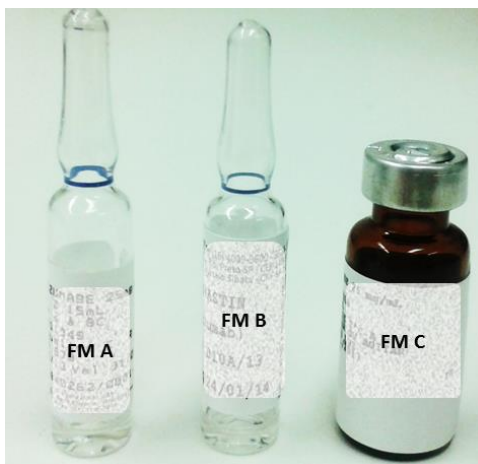
A fim de avaliar se o fracionamento ocorre com o volume requisitado e de forma homogênea, determinamos o conteúdo de amostras de Avastin[®] fracionado pelo método de determinação do peso no qual o conteúdo de cada fração é dado pela diferença entre as pesagens do recipiente cheio e vazio. Para cada farmácia avaliamos 24 frações do medicamento.

Para as frações provenientes das farmácias A e B, acondicionadas em ampolas (**Figura 8**), os rótulos foram removidos, as ampolas foram quebradas no local indicado e cada ampola aberta foi pesada sem o vidro gerado na quebra.

Para as frações provenientes da Farmácia C, acondicionadas em frascos-ampola (**Figura 8**), os lacres metálicos e os rótulos foram removidos e cada recipiente foi pesado com a respectiva tampa.

Com auxílio de micropipeta, o conteúdo de cada fração foi transferido para microtubos de 0,2 mL, pesado e armazenado para análises sequentes. O peso das frações foi usado para fins comparativos e para confirmação dos resultados.

Figura 8 – Frações recebidas de três farmácias (FM A-C).



Com auxílio de pipeta de Pasteur, as ampolas, os frascos-ampola e as tampas correspondentes foram delicadamente lavados 5 vezes com água, 1 vez com etanol absoluto e secos em estufa a 105 °C até peso constante. Após resfriamento à temperatura ambiente, pesaram-se novamente as ampolas e os frascos-ampola com suas tampas correspondentes (BRASIL, 2010).

Todas as pesagens foram realizadas em balança analítica calibrada AX205 Delta Range® (Mettler Toledo). A diferença entre as duas pesagens representa o peso do conteúdo.

Seguindo as recomendações da 5ª edição da farmacopeia brasileira, os volumes individuais correspondentes (V) foram calculados utilizando a expressão:

$$V = \frac{\text{peso do conteúdo (g)}}{\text{densidade de massa (g/mL)}} \quad (2)$$

A densidade de massa do Avastin® foi determinada a 20 °C pesando-se 1 mL da formulação e 1 mL de água e aplicando-se a expressão:

$$\text{Densidade de massa (Avastin)} = d(\text{água}) \times \frac{\text{Peso (Avastin)}}{\text{Peso (Água)}} + 0,0012 \quad (3)$$

De acordo com a 5ª edição da farmacopeia brasileira, o volume médio não é inferior ao volume declarado se o volume individual de nenhuma das unidades testadas for inferior a 95,0%.

Utilizando-se o programa Graphpad Prism 5, as médias dos volumes das frações das três farmácias foram comparadas por ANOVA com pós-teste de Tukey. Adicionalmente, a fim de avaliar se os volumes das frações diferem significativamente do requisitado para o fracionamento aplicou-se teste t de hipóteses para uma amostra (one sample *test-t*).

2.3. Indução de agregados e outras instabilidades na solução de BVZ (Avastin®)

A fim de obtermos amostras contendo as instabilidades características de formulações proteicas, submetemos o BVZ a perturbações mecânicas e térmicas.

Alíquotas de 500 µL de BVZ (Avastin®, Roche) foram transferidas para microtubos de polipropileno e submetidas a aquecimento entre 40 e 80 °C por diferentes intervalos de tempo (entre 10 e 180 minutos). Alternativamente, frações de Avastin® foram submetidas a estresse mecânico em agitador orbital (IKA®, Labortechnik), à temperatura ambiente, por 8 horas.

Para a triagem inicial foram avaliadas a precipitação evidente e os perfis eletroforético e cromatográfico das amostras.

2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para a separação das proteínas e caracterização das amostras, eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) contendo lauril sulfato de sódio (SDS) foi realizada segundo Laemmli (1970) utilizando-se:

- acrilamida-bisacrilamida 29:1, 40% p/v, grau ultra puro (ACRYL/BIS®, Amresco®, EUA);
- tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIZMA® base, Sigma Aldrich, EUA);
- lauril sulfato de sódio (Synth®, Labsynth®, Brasil);
- persulfato de amônio (Promega, EUA);
- glicina;
- azul de bromofenol;

- corante azul de coomassie (Brilliant Blue G, Sigma Aldrich, EUA);
- metanol;
- ácido acético glacial;
- água ultrafiltrada (Milli Q plus, Millipore, EUA) e;
- sistema para eletroforese Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell (Biorad, EUA).

Foram avaliados os perfis cromatográficos obtidos em géis de separação contendo acrilamida-bisacrilamida (ACRYL/BIS[®], Amresco[®]) a 7%. As soluções foram polimerizadas entre duas placas de vidro mantidas a uma distância de 0,75 mm.

Para definir as condições ideais da eletroforese, amostras de BVZ controle e submetido a estresse térmico, foram diluídas para 1,5µg/µL em tampão de amostra contendo 6,1% de solução Tris-HCl 2 M, pH 6,8; 4,9% de glicerol; 1,9% de SDS e 0,05% de azul de bromofenol. As soluções foram desnaturadas em banho-maria a 90°C por 10 minutos.

A cada canaleta foram aplicados 9 µL das soluções diluídas, o equivalente a 13,5 µg do anticorpo. A separação das proteínas foi conduzida a 100 V, à temperatura ambiente por aproximadamente 90 minutos.

Para o estudo da qualidade do medicamento fracionado, para cada farmácia comparamos o perfil eletroforético de 9 frações com o medicamento referência. Para isso, Avastin[®] referência e fracionado foram diluídos para 1,5 µg/µL em tampão de amostra. As soluções foram desnaturadas em banho-maria a 90°C por 10 minutos.

A cada canaleta foram aplicados 6 µL das soluções diluídas, equivalente a 9 µg de anticorpo.

Após a corrida eletroforética, o gel foi mantido por 30 minutos em solução corante de Azul de Coomassie à temperatura ambiente, sob agitação. Em seguida, o gel foi submerso em solução descorante de proteínas (metanol 10% e ácido acético 7% em água) e escaneado para observação das bandas. Alternativamente, um método de coloração pela prata foi testado.

2.5. Cromatografia a Líquido de Alta eficiência por Exclusão de Tamanho (CLAE-ET)

2.5.1. Validação do método de análise do BVZ por CLAE

Para a análise cromatográfica do fármaco, adaptou-se a metodologia desenvolvida por Gomes e col. (2012).

As análises foram realizadas em cromatógrafo acoplado a detectores de arranjo de diodos (DAD) e UV (Shimadzu, Japão), utilizando-se a coluna de exclusão de tamanho de alta resolução BioSuite[®] 250; 5 µm; 7,8 x 300 mm (Waters, Japão) e os demais parâmetros cromatográficos relacionados na **Tabela 2**.

Como fase móvel e diluente das amostras foi utilizado tampão salina-fosfato (PBS) pH 7,4 preparado com 2,38 g de fosfato de sódio dibásico anidro; 0,19 g de fosfato de potássio monobásico anidro e 8,00 g de cloreto de sódio, diluídos em água purificada até um volume final de 1000 mL.

A linearidade foi avaliada a partir de 3 curvas obtidas em dias distintos nas concentrações de 2,5; 5; 12,5; 25; 50 e 75 µg/mL de BVZ. Os resultados foram tratados estatisticamente pelo método dos mínimos quadrados, obtendo-se a regressão linear.

Todas as soluções foram diluídas em tampão PBS até a concentração final desejada, filtradas em membranas contendo poros de 0,45 (Durapore, Millipore[®]) e injetadas em triplicata no cromatógrafo, registrando-se os valores das áreas.

Tabela 2 - Parâmetros cromatográficos utilizados para validação do método analítico e análise da estabilidade do bevacizumabe (Avastin[®])

Parâmetro	Condição Empregada
Detecção	DAD e UV ($\lambda = 205 \text{ nm}$)
Coluna	BioSuite [®] 250, 5 µm, HR SEC (7.8 x 300 mm), Waters [®]
Fluxo	1,0 mL/min
Fase Móvel	Tampão salina-fosfato pH 7,4
Volume de Injeção	20 µL

A especificidade do método foi testada analisando-se solução placebo contendo 60 mg/mL de D-(+)-trealose; 0,04% de Tween 20; 23,2 mg fosfato de sódio monobásico monohidratado e 4,8 mg fosfato de sódio anidro (FDA, 2009).

A repetibilidade foi avaliada pelo preparo em triplicata de 3 concentrações de BVZ (2,5; 50 e 75 µg/mL), totalizando 9 determinações, e pela avaliação do desvio padrão relativo (DPR) entre os pontos.

A precisão intermediária foi avaliada estimando-se o desvio padrão relativo (DPR) entre curvas de calibração obtidas em 3 dias diferentes.

Para o estudo da robustez foram avaliadas as variações de fluxo no intervalo de 0,99 a 1,01 mL/min e de pH da fase móvel no intervalo de 7,3 a 7,5. A análise foi feita avaliando-se as variações nas áreas encontradas para o BVZ na concentração 50 µg/mL pelo método de análise de variâncias (ANOVA).

2.5.2. Análise cromatográfica do Avastin[®] para identificação de instabilidades

Para os ensaios preliminares e desenvolvimento da metodologia, empregando o método descrito no item anterior, compararam-se os perfis cromatográficos do BVZ controle e das amostras submetidas às diferentes condições de estresse previamente descritas.

O mesmo método foi empregado para fracionar e quantificar monômeros e manipulação.

Utilizando-se o método previamente validado e os parâmetros resumidos na **Tabela 2**, avaliou-se o perfil cromatográfico das amostras em equipamento Shimadzu com detector UV. As separações cromatográficas foram monitoradas em 205 nm por meio do programa LCSolution (Shimadzu, Japão).

Para preparo das amostras, BVZ referência e 15 frações de cada farmácia foram diluídas para a concentração teórica de 50 µg/mL a qual se encontra dentro da faixa de linearidade. Para isso, 20 µL das amostras foram pipetados para balão

volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com solução salina tamponada pH 7,4. Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada amostra.

Previamente à injeção, as amostras foram diluídas em tampão salina-fosfato (PBS) pH 7,4 para a concentração teórica de 50 µg/mL e filtrados em filtro com poros de 0,45 µm (Durapore, Millipore®).

Como fase móvel e diluente das amostras, utilizou-se solução salina tamponada pH 7,4, preparada conforme previamente descrito.

Para evitar erros resultantes do desgaste da coluna ao longo das análises, as amostras utilizadas como referências foram reinjetadas a cada 10 injeções e as novas áreas obtidas foram usadas para comparação.

Para o tratamento matemático foram estudados os parâmetros tempo de retenção (tr) e área sob a curva (AUC).

Para cada amostra, calculou-se a porcentagem de anticorpos nas formas monoméricas e agregadas dividindo-se a área de cada pico (A_x) pela soma das áreas do cromatograma (A_{total}):

$$\% \text{ monômeros: } (A_{\text{monômeros}}/A_{\text{total}}) \times 100 \quad (4)$$

$$\% \text{ agregados: } (A_{\text{agregados}}/A_{\text{total}}) \times 100 \quad (5)$$

A fim de avaliar se houve perda monomérica nas amostras, proveniente de agregação, fragmentação ou outros tipos de degradação, as áreas dos picos principais das amostras aquecidas e do BVZ controle foram comparadas (HAWEEt al., 2009):

$$\text{Concentração relativa de monômeros (\%)} = A_{\text{mon. amostra}}/A_{\text{mon. referência}} \quad (6)$$

2.6. Análise Turbidimétrica

Aa turbidez (opalescência) das amostras foi investigada pela medida da densidade ótica em 350 e 550 nm, onde nenhum cromóforo intrínseco da formulação absorve. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS Evolution® 201 (Thermo Scientific®) utilizando-se cubeta de quartzo microretangular, com 1 cm de caminho

ótico e capacidade volumétrica de 0,7 mL (LAHLOU et al., 2009; MAHLER et al., 2005).

Para os testes preliminares e desenvolvimento da metodologia, a turbidez (opalescência) do BVZ controle e submetido a aquecimento (2 horas a 62 °C) foi investigada.

Buscando-se reduzir o volume de amostra requerido para a análise turbidimétrica, compararam-se os resultados de turbidez obtidos para as amostrassem diluição prévia e com diluição de 10 vezes em tampão fosfato (51 mM, pH 6,2). Para eliminar interferências provenientes do diluente, o tampão foi previamente filtrado em membrana com poros de 0,22 µm (Millex[®] GV, Millipore).

A fim de investigar a presença de agregados proteicos insolúveis e material particulado no medicamento fracionado, 15 frações de Avastin[®] de cada farmácia e lote foram distribuídas em três *pools*. Cada uma das amostras (*pool*) e o Avastin[®] referência foram diluídos em triplicata para 2,5 mg/mL. Tampão fosfato de sódio (51 mM, pH 6,2) previamente filtrado em membrana de 0,22 µm (Millex[®] GV, Millipore) foi utilizado como diluente das amostras e branco da análise.

A absorbância foi medida transferindo-se as soluções para cubeta de quartzo microretangular, com 1 cm de caminho ótico e capacidade volumétrica de 0,7 mL. Para evitar a interferência causada por partículas do ar, as diluições e preenchimento da cubeta foram realizados dentro de fluxo laminar. Retiraram-se as amostras do fluxo laminar somente após tamponamento das cubetas com a respectiva tampa de politetrafluoretileno (PTFE).

O valor médio das absorbâncias obtidas para cada amostra foi calculado e comparado ao valor médio do BVZ adotado como referência.

Para avaliar a formação de agregados insolúveis visíveis, obteve-se a razão entre a média das densidades óticas (OD) do BVZ controle (OD_{controle}) e aquecido (OD_{aquecido}):

$$\text{Partículas visíveis formadas (\%)} = [1 - (\text{OD}_{\text{controle}}/\text{OD}_{\text{aquecido}})] \times 100 \quad (7)$$

2.7. Espalhamento da Luz Dinâmico (DLS)

Utilizando o equipamento Zeta Sizer 3000 HSA (Malvern Instruments) com laser de 633 nm e detector posicionado com ângulo de 90° os perfis de espalhamento da luz dinâmico das amostras de Avastin[®] foram obtidos e comparados.

Para os ensaios preliminares os diâmetros hidrodinâmicos das partículas do BVZ controle e submetido a aquecimento foram comparados. Previamente à leitura, ambas as amostras foram diluídas para a concentração 2,63 mg/mL em tampão fosfato (51 mM, pH 6,2). Para a eliminação de interferentes, o diluente foi previamente filtrado em membrana com poros de 0,22 µm (Millex[®] GV, Millipore). Para a análise, 2 mL de cada amostra foram transferidos para cubetas descartáveis de poliestireno contendo 1 cm de caminho ótico (Sarstedt[®]).

A fim de avaliar se a concentração e tampão adotados na diluição da amostra alteram significativamente o perfil de espalhamento de luz do Avastin[®], uma amostra não diluída (25 mg/mL) foi analisada para fins comparativos.

Para a análise do medicamento fracionado, formaram-se *pools* a partir de 5 frações de Avastin[®] totalizando 3 *pools* para cada farmácia. Realizou-se análise das amostras em triplicata, registrando-se os valores médios.

Previamente à leitura, ambas as amostras foram diluídas para a concentração 2,63 mg/mL em tampão fosfato (51 mM, pH 6,2) e filtrada conforme descrito anteriormente. Para a análise, 2 mL de cada amostra foram transferidos para cubetas descartáveis de poliestireno contendo 1 cm de caminho ótico (Sarstedt[®]).

Por meio do software Zeta Sizer (Malvern Instruments) foram obtidos os gráficos de distribuição de tamanho por intensidade, o tamanho hidrodinâmico médio e o índice de polidispersão de cada amostra.

2.8. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

Empregou-se NTA para avaliação da distribuição de tamanho de partículas nas amostras. Para isso, utilizou-se o analisador de partículas NanoSight LM14 HS (Malvern) e o software Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) Version 2.3 para

captura dos vídeos e análise dos dados. Para cada amostra, os vídeos foram adquiridos por 60 segundos, com a câmera posicionada no nível 12.

Para os ensaios preliminares, as amostras de BVZ foram diluídas 200 vezes previamente à injeção na câmera de análise. Como diluente, utilizou-se tampão fosfato (51 mM, pH 6,2) filtrado em membrana com poros de 0,22 µm (Millex[®] GV, Millipore). As amostras foram injetadas no compartimento de análise com o auxílio de seringas estéreis de polipropileno (BD).

Amostras de BVZ foram submetidas a aquecimento na própria câmera de análise (55 °C por 5 minutos) e o perfil de distribuição de tamanho após o aquecimento foi comparado o de amostras controle. Para avaliação da reprodutibilidade da técnica, a análise foi realizada com 3 soluções de BVZ provenientes de diferentes lotes.

Para o estudo da qualidade do medicamento fracionado, formaram-se *pools* a partir de 5 frações de Avastin[®] totalizando 2 *pools* para cada farmácia.

Cada uma das amostras e o BVZ referência foram diluídos 50 vezes tampão fosfato de sódio (51 mM, pH 6,2) filtrado em unidades filtrantes de 0,22 µm (Millex[®] GV, Millipore). As amostras foram injetadas no compartimento de análise com o auxílio de seringas estéreis de polipropileno.

Os resultados foram expressos como gráficos de distribuição de tamanho e valores de tamanho médio das partículas. O tamanho médio e seu desvio padrão obtido pelo *software* correspondem à média aritmética calculada a partir dos valores de tamanho de todas as partículas rastreadas na análise.

2.9. Espectrometria de Massa

A Espectrometria de Massa é uma ferramenta analítica essencial em estudos relativos a anticorpos monoclonais devido à sua resolução estrutural superior em relação a outras técnicas. Dessa forma, avaliamos a aplicabilidade da técnica para investigação de instabilidades no BVZ (ZHANG *et al.*, 2009).

Para isso, BVZ controle e submetido a aquecimento (2 horas a 62 °C) foram diluídos para a concentração 8 µg/µL em ácido tricloroacético (TFA) a 0,1%. As soluções

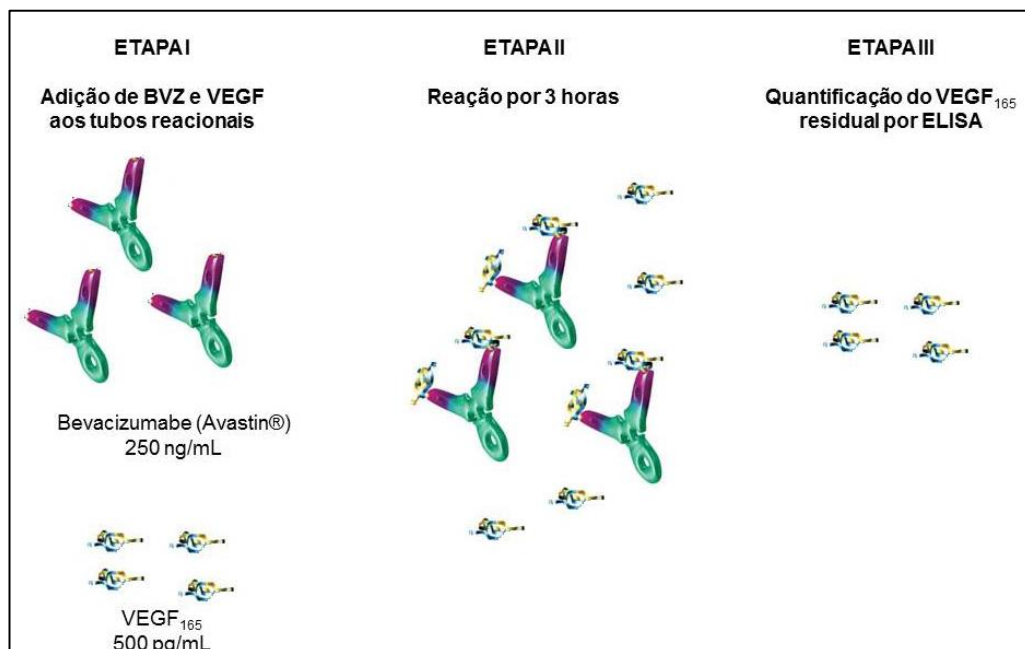
diluídas foram misturadas à solução saturada de ácido sinapínico, utilizada como matriz, na proporção 1:2 v/v.

1 μ L da mistura amostra diluída/matriz foi aplicado sobre a placa de metal polida AnchorChip[®] MTP 400/384 (Bruker) e evaporada à temperatura ambiente. Os espectros foram obtidos em espectrômetro de massa MALDI-TOF AutoFlex III equipado com smartbeam (Bruker Daltonics) e controlado pelo programa COMPASS[®] 1.2 (Bruker Daltonics). Os espectros foram adquiridos no modo linear e o poder do laser (355nm) foi manualmente ajustado para melhor relação sinal-ruído.

2.10. Avaliação da eficácia do BVZ por reação com seu ligante biológico

Para avaliação da atividade biológica do Avastin[®] fracionado, nos baseamos no trabalho de Chen *et al.* (2009) no qual a reação entre o BVZ e seu ligante biológico foi promovida, com posterior quantificação do VEGF₁₆₅ residual (**Figura 9**).

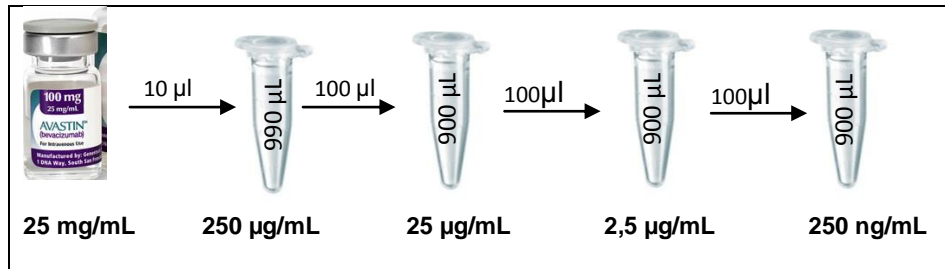
Figura 9 – Esquema representativo da avaliação da eficácia do BVZ por reação com seu ligante biológico.



Para o ensaio, 20 frações das farmácias A e C foram divididas em 4 *pools*, enquanto 10 frações da farmácia B foram divididas em dois *pools*. BVZ referência e fracionado foram então diluídos para 250 ng/mL (conforme esquema representado na **figura 10**). Como diluente utilizou-se tampão salina fosfato pH 7,4 (PBS)

contendo 0,2% de albumina de soro bovino de alta pureza (Sigma) e esterilizado em membrana com poros de 0,22 μm (Stericup[®], Millipore[®]). VEGF₁₆₅ (R&D Systems) foi diluído utilizando o mesmo tampão.

Figura 10 – Esquema de diluição do BVZ para uso em ensaio funcional.



Para a reação, BVZ (250 ng/mL) e VEGF₁₆₅ (500 pg/mL) foram adicionados a tubos de polietileno na proporção 1:1 e a mistura foi homogeneizada e incubada por 3 horas, a 30 °C, sob agitação de 180 rpm em agitador KS 400 i control (IKA[®], EUA). Como controle, submeteram-se alíquotas de VEGF₁₆₅ na concentração final de 250 pg/mL às mesmas condições dos tubos reacionais a fim de avaliar se durante a reação ocorre degradação do antígeno.

Para garantir a confiabilidade dos resultados, para cada amostra analisada foram realizadas duas reações (reação em duplicata).

Ao final da reação, o VEGF₁₆₅ residual livre nas misturas foi quantificado em duplicata pelo kit de ELISA (Quantikine[®]; R&D systems), de acordo com as recomendações do fabricante.

Resumidamente, 200 μL de cada meio reacional e de cada ponto da curva de calibração foram pipetados para placa de ELISA de 96 poços revestida com anticorpo monoclonal específico para o VEGF e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. O conteúdo dos poços foi aspirado com auxílio de micropipeta e os poços foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem fornecido pelo fabricante para remoção de substâncias não ligadas. Em seguida, foram adicionados a cada poço 200 μL de anticorpo policlonal específico para VEGF e conjugado a peroxidase. Após mais uma etapa de lavagem foram adicionados a cada poço 200 μL de solução de tetrametilbenzidina (TMB) como substrato para

desenvolvimento de cor. As placas foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente e lidas em 450 nm no leitor Spectramax Plus 384 (Molecular Devices). Os dados foram adquiridos pelo programa SoftMax[®] Pro (Molecular Devices).

A eficácia de ligação do BVZ das amostras foi comparada ao referência, obtendo-se a eficiência relativa de ligação (%):

$$\text{Eficiência relativa de lig. (\%)} = \text{VEGF}_{\text{Consumido pela amostra}} / \text{VEGF}_{\text{Consumido pelo referência}} \quad (8)$$

Sendo,

$$\text{VEGF}_{\text{Consumido}} = \text{VEGF}_{\text{Inicial}} - \text{VEGF}_{\text{Final (quantificado)}} \quad (1)$$

2.11. Avaliação da eficácia do BVZ por ELISA indireto

Microplacas de poliestireno contendo 96 poços (costar[®]) foram sensibilizadas com 100 µL de VEGF₁₆₅ diluído a 0,2 µg/mL em tampão carbonato-bicarbonato de sódio pH 9,6. As microplacas foram tampadas com selos adesivos descartáveis, incubadas em câmara úmida a 4°C por 15 horas e lavadas 3 vezes com tampão de lavagem. Para efeitos comparativos testou-se a sensibilização com VEGF₁₆₅ fornecido pela Sigma Aldrich[®] e pela R&D systems[®].

Para as etapas de lavagens, utilizou-se tampão salina-fosfato contendo polissorbato 20 a 0,05% (Tween 20, Sigma Aldrich). Previamente a cada incubação as placas foram tampadas com adesivos descartáveis.

Após a sensibilização, os poços foram bloqueados com 200 µL de albumina de soro bovino para biologia molecular (BSA, Sigma Aldrich) a 2% em tampão salina fosfato (PBS). Após incubação de 1 hora à temperatura ambiente, as placas foram lavadas duas vezes e foram adicionados aos poços 100 µL das soluções de BVZ para construção das curvas de calibração.

As soluções de BVZ aplicadas à placa foram diluídas em tampão-salina fosfato contendo 0,1% de albumina de soro bovino para biologia molecular (BSA, Sigma Aldrich) em duas faixas de concentrações: 3,12 a 200 ng/mL e 9,76 a 1250 µg/mL.

Após incubação, aspirou-se o conteúdo dos poços com micropipeta, lavou-se 3 vezes com tampão de lavagem e adicionou-se 100 μ L de anticorpo de coelho anti-IgG humano conjugado a peroxidase (Sigma[®]) diluído em tampão PBS/BSA 0,1%.

Para fins comparativos, foram variados o tempo de incubação da amostra (2 e 3 horas) e a concentração do anticorpo conjugado (0,02%, 0,025% e 0,03%).

A solução de anticorpo conjugado foi aspirada dos poços e esses foram rigorosamente lavados 5 vezes com tampão de lavagem. Os poços foram então incubados com o substrato enzimático, protegidos da luz, entre 10 e 30 minutos, de acordo com a intensidade da cor desenvolvida.

Para o desenvolvimento do método foram testados os substratos enzimáticos tetrametilbenzidina (TMB) e ortofenilenodiamina (OPD).

Transcorrida a incubação, a reação colorimétrica foi interrompida pela adição de 50 μ L de ácido sulfúrico 2N a cada poço. Procedeu-se com a leitura da densidade ótica dos poços no leitor Spectramax Plus 384 (Molecular Devices) a 450 e 490 nm para os poços incubados, respectivamente, com TMB e OPD. Os dados foram adquiridos pelo programa SoftMax[®] Pro (Molecular Devices).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

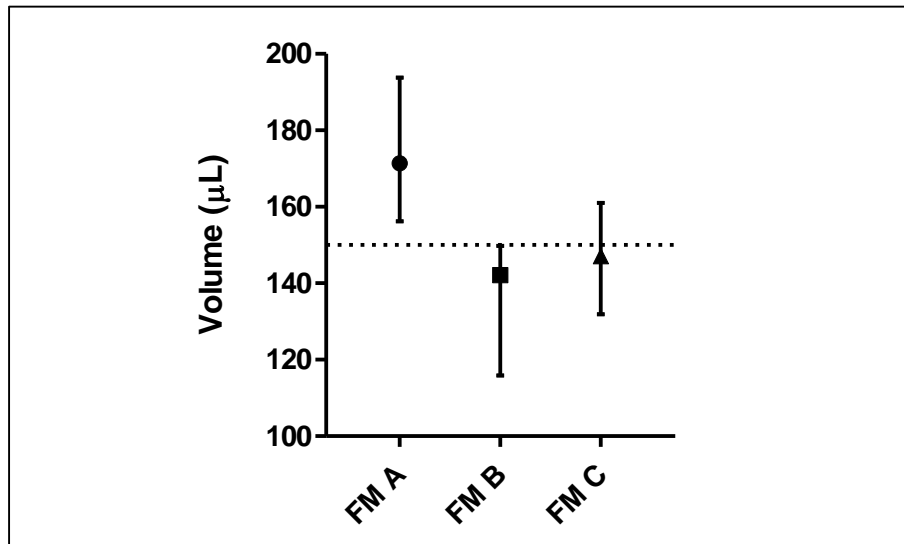
3.1. Determinação do volume das frações

Para assegurar a administração de doses corretas, cada unidade do lote fracionado deve conter volume próximo da quantidade solicitada pelo oftalmologista.

Resolvendo-se a equação 3 com os pesos obtidos para 1 mL de Avastin[®] (1,03799 g) e 1 mL de água purificada (0,98393 g), encontrou-se densidade de massa do medicamento equivalente a 1,05424 g/mL. Esse valor foi utilizado para calcular o volume das frações a partir dos pesos registrados.

Dentre as amostras fracionadas analisadas, as frações da farmácia A apresentaram conteúdo significativamente superior ao requisitado enquanto as frações das farmácias B e C apresentaram conteúdo médio próximo ao declarado (**Figura 11**).

Figura 11 – Conteúdo das frações de Avastin[®] expresso como média (símbolos) e distância entre os volumes mínimos e máximos registrados (barra de erro); n=24.



Conforme exposto na **tabela 3**, o volume médio registrado para as 24 frações da farmácia A corresponde a 114% do volume requisitado. Nenhuma fração apresentou volume inferior a 100% do requisitado, estando o volume de todas as frações na faixa entre 104,1% e 129,2% do conteúdo declarado.

As frações FM B e C apresentaram conteúdo médio próximo ao declarado, respectivamente, 94,8 e 98,1%, no entanto, com várias frações com conteúdo inferior a 95% .

As frações da farmácia B apresentaram volume médio equivalente a 95% do requisitado, estando o volume de todas as frações na faixa entre 77,3 e 99,9%. 5 das 24 frações analisadas apresentaram volumes 95% inferior ao rotulado.

As frações da farmácia C apresentaram volume médio equivalente a 98% do requisitado, estando o volume de todas as frações na faixa entre 77,3 e 99,9%.

As frações da farmácia C apresentaram volumes entre 87,91 e 107,35% do declarado.

Dentre as 24 amostras analisadas para cada fornecedor, 5 amostras da farmácia B e 7 da farmácia C apresentaram conteúdo 95% inferior ao requerido, mantendo-se fora da especificação farmacopeia.

Tabela 3 – Pesos e volumes mínimo, máximo, médio e desvio padrão registrados para as frações de Avastin[®]; n=24.

Amostra	Peso Médio (mg)	Volume médio(μL) ^a	Volume mínimo (μL) ^a	Volume máximo (μL) ^a	Volume médio em relação ao declarado (%)
FM A	180,63 ± 9,41	171,34 ± 8,92*	156,21	193,77	114,2
FM B	149,85 ± 9,62	142,14 ± 9,12**	115,88	149,81	94,8
FM C	152,11 ± 8,66	147,10 ± 6,57**	131,86	161,03	98,1

^aObtido a partir dos pesos registrados e da densidade de massa do Avastin[®].

*Médias significativamente diferentes do volume requisitado (150 μL) (*p < 0,05, **p < 0,01, teste t de hipóteses).

Por ANOVA, encontrou-se que os volumes das frações da farmácia A diferem-se significativamente dos volumes das demais farmácias. Não se encontrou diferença estatisticamente significativa entre as frações das farmácias B e C.

Utilizando-se o teste de hipóteses para uma amostra (*one sample t-test*), comparamos os volumes médios obtidos com o volume requisitado para as farmácias, 150 μL. Para as frações dos três fornecedores, encontramos diferença significativa entre a média de volumes obtidos e o volume hipotético (150 μL) obtendo-se valor p inferior a 0,01 para as frações da farmácia A e inferiores a 0,05 para as frações das farmácias B e C.

3.2. Indução de agregados e outras instabilidades na solução de BVZ (Avastin[®])

Foi visualizada precipitação em todas as alíquotas submetidas a temperaturas acima de 65 °C. Em temperaturas inferiores, a visualização de precipitação depende do tempo de aquecimento. Alíquotas aquecidas a 62,0 °C por até duas horas não apresentaram precipitação evidente, ao passo que houve visualização de precipitado em alíquotas submetidas à mesma temperatura por quatro horas.

Também não foi verificada precipitação em alíquotas submetidas a 40 °C por 3 horas.

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Nas alíquotas submetidas a 62 °C, a formação de agregados é facilmente visualizada em gel de poliacrilamida a 7%, caracterizando-se pela formação de duas bandas extras, de alta massa molecular, em relação ao controle (**Figura 12a**). Em condições mais brandas de aquecimento, identifica-se apenas uma banda extra de baixa intensidade no gel de poliacrilamida, conforme o observado para alíquotas aquecidas a 40 °C (**Figura 12a**). Não foi detectada diferença entre os perfis eletroforéticos obtidos para o BVZ controle e submetido à agitação por 8 horas.

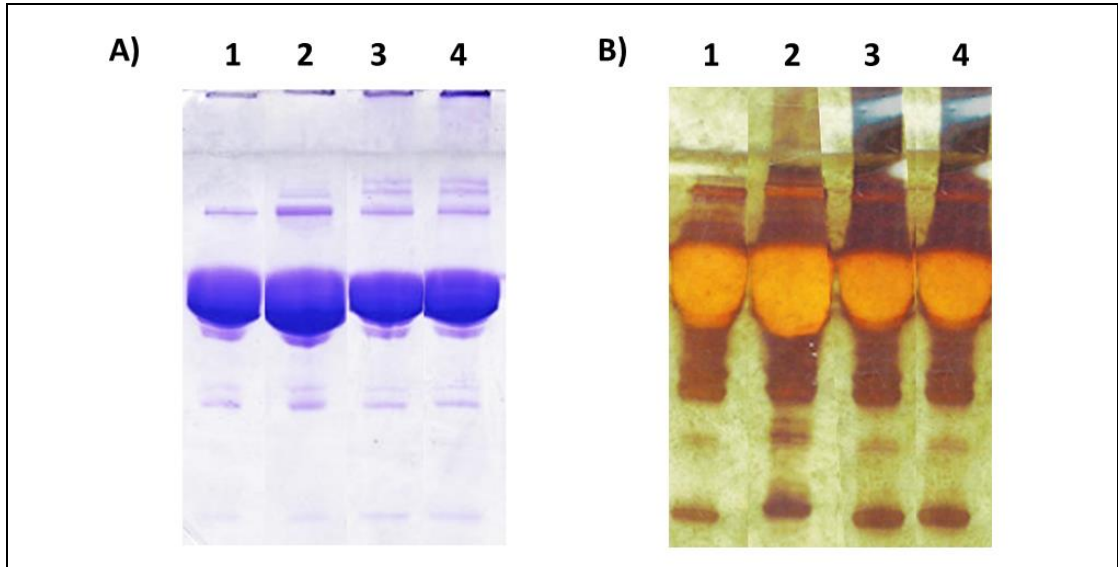
Nas demais concentrações de gel testadas (9, 10 e 12% de acrilamida-bisacrilamida), foi observada apenas uma banda na região superior do gel para todas as amostras controle e aquecidas. Dessa forma, sugere-se que em géis nessas concentrações, não há separação adequada das proteínas de diferentes massas moleculares o que impede a visualização da instabilidade. Apesar de altamente sensível, o método de coloração pela prata mostrou-se menos reprodutível (**Figura12b**).

Baseado no perfil eletroforético e na análise visual das soluções aquecidas, definimos o aquecimento a 62 °C, entre uma e duas horas, como a condição de estresse mais apropriada para obtenção do padrão de degradação a ser utilizado no desenvolvimento e avaliação dos métodos selecionados.

Diante desses resultados, optou-se pela eletroforese em géis a 7% seguida de coloração por azul de Coomassie para caracterização do produto fracionado.

Conforme previamente demonstrado, os géis de poliacrilamida na concentração 7% permitem uma resolução adequada entre monômeros, agregados naturalmente encontrados na formulação e agregados de maior tamanho induzidos por perturbação térmica.

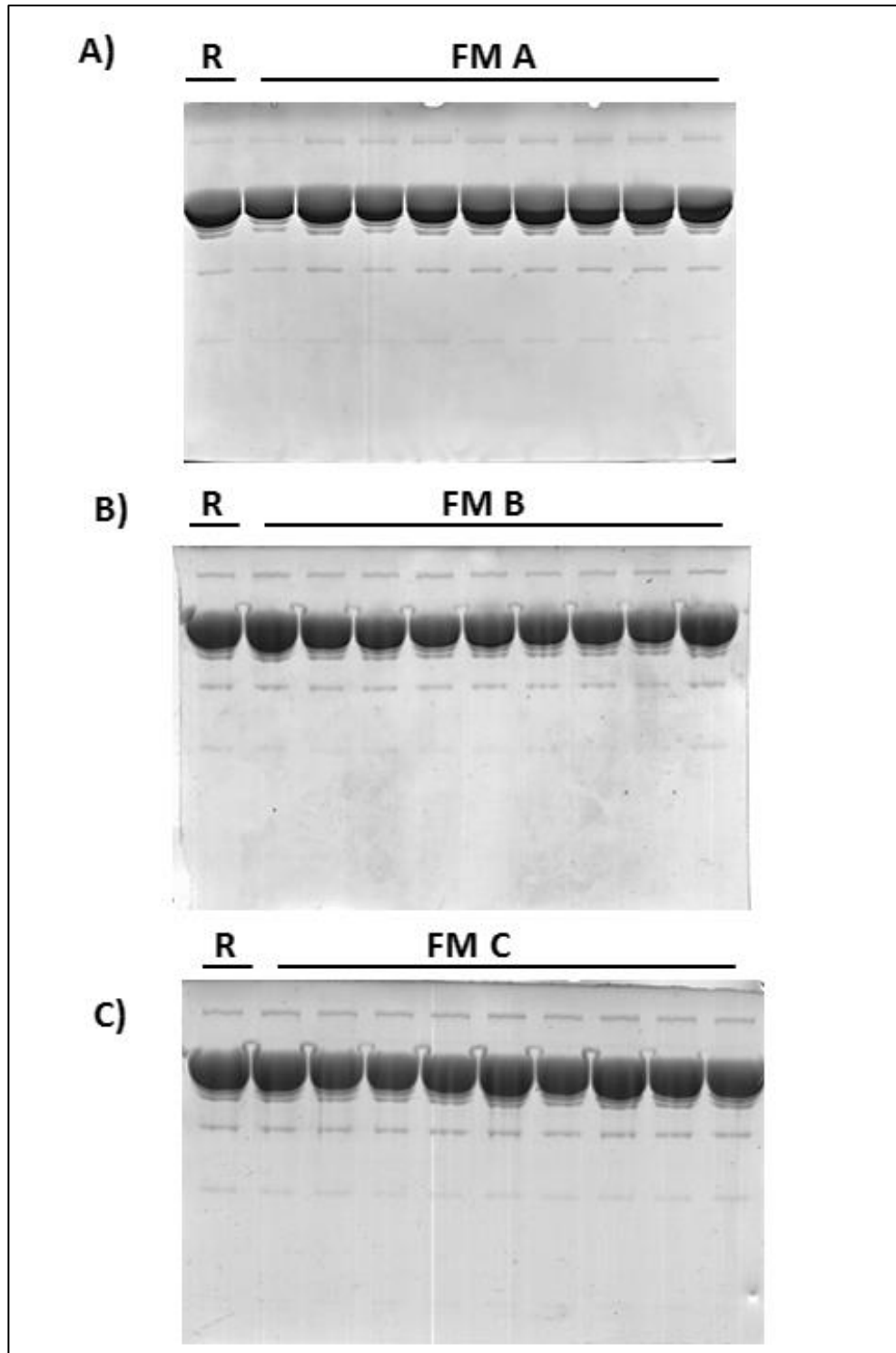
Figura 12 – Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7% (SDS-PAGE). (1) BVZ armazenado a 4 °C. Alíquotas aquecidas a (2) 40 °C por 3 horas, (3) 62 °C por 1 hora e (4) 62 °C por 2 horas. A amostra submetida à degradação térmica possui duas bandas extras de alto peso molecular, típicas de agregados proteicos. Gel corado com (A) Coomassie Blue e (B) solução de prata.



A **Figura 13** registra o perfis eletroforéticos obtidos para o Avastin[®] referência e fracionado durante o estudo da qualidade do medicamento fracionado pelas farmácias de manipulação. Em todas as amostras foi observada uma banda de alta densidade óptica cercada por três bandas de menores intensidades.

Perfis similares foram encontrados para as amostras de Avastin[®] fracionado e o medicamento referência, não sendo encontradas bandas extras para nenhuma das 9 frações analisadas. Assim, os resultados da eletroforese sugerem que as amostras analisadas não apresentam contaminação por agregados de alto peso molecular ou a fragmentos proteicos.

Figura 13 – Géis de poliacrilamida representando o perfil eletroforético do BVZ referência (R) e fracionado (FM A-C; n=9 para cada farmácia).

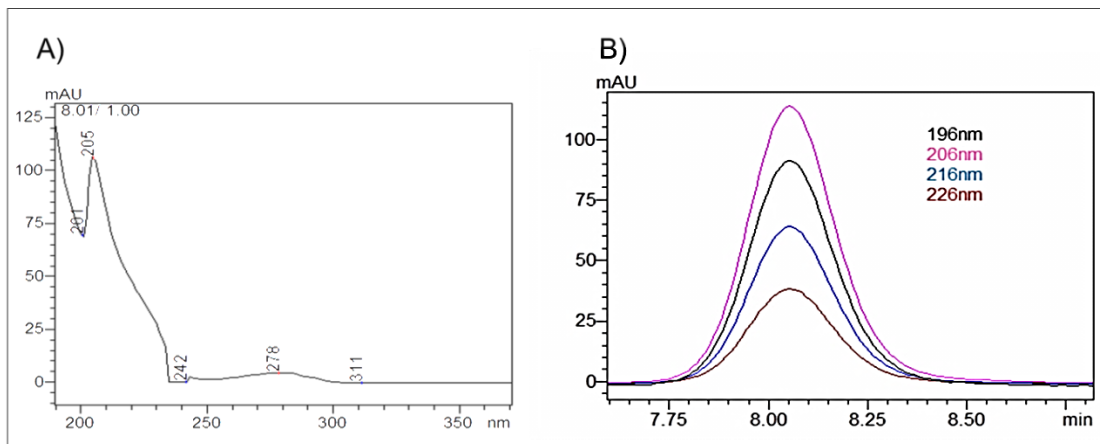


3.4. Cromatografia a Líquido de Alta eficiência por Exclusão de Tamanho (CLAE-ET)

3.4.1. Validação do método de análise do BVZ por CLAE

Inicialmente, utilizou-se o detector de arranjo de diodos (DAD) para identificar o comprimento de onda na região do UV mais adequado para a análise. Na varredura espectral na região do ultravioleta encontrou-se maior intensidade de absorção pelo fármaco em 205 nm e, portanto, este foi o comprimento de onda selecionado para as análises cromatográficas (**Figura 14**).

Figura 14 – Varredura espectral do pico principal do BVZ.



No comprimento de onda selecionado, três picos foram encontrados nos cromatogramas do BVZ: um pico principal correspondente ao anticorpo na sua forma monomérica (eluído em cerca de 8 minutos) e dois picos de menor tempo de retenção correspondentes a oligômeros e agregados de alta massa molecular (**Figura 15**).

A especificidade do método foi demonstrada, pois não foram registrados picos no tempo de retenção do fármaco no cromatograma referente à solução salina tamponada pH 7,4 contendo os excipientes do Avastin®.

O método se mostrou linear, para o intervalo de concentrações entre 2,5 e 75 µg/mL, obtendo-se coeficiente de regressão linear (r^2) superior a 0,99 para as três curvas (**Figura 16**).

Figura 15 –Perfil de eluição do BVZ (Avastin®) por CLAE.

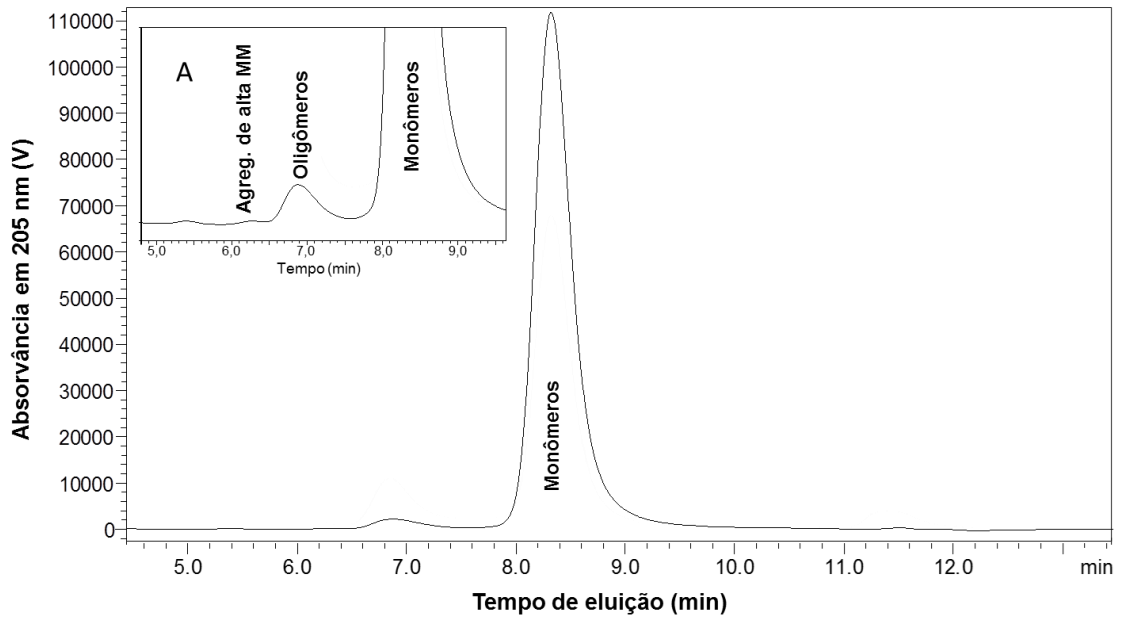
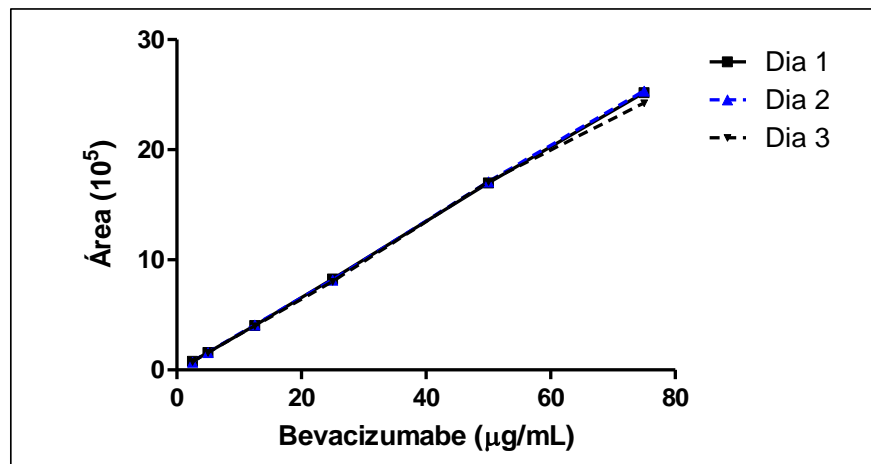


Figura 16 - Curvas de calibração obtidas na avaliação da linearidade.



A repetibilidade e a precisão intermediária do método foram expressas em termos de desvio padrão relativo (DPR) (**Tabelas 4 e Tabela 5**). Todos os valores de DPR obtidos, tanto para a precisão intra-corrída quanto para a precisão inter-corrídas, encontram-se abaixo de 5%, estando de acordo com o que preconiza a RE 899 da ANVISA.

Tabela 4 – Repetibilidade do método para quantificação de monômeros de BVZ por CLAE

BVZ ($\mu\text{g/mL}$)	Área média (10^5)	DPR (%)
2,5	0,76	2,65
25	8,09	0,87
75	24,55	1,21

Tabela 5 – Precisão intermediária do método de quantificação de monômeros do BVZ por CLAE.

BVZ ($\mu\text{g/mL}$)	Área média (10^5)	DPR (%)
2,5	0,74	3,79
5	1,58	0,87
12,5	4,04	1,12
25	8,15	1,51
50	17,06	0,36
75	24,92	2,43

Quanto à robustez, o método se mostrou robusto diante das variações de fluxo no intervalo proposto (0,99 a 1,01 mL/min) e das variações de pH da fase móvel (7,3 a 7,5), pois não houve diferença estatisticamente significativa pela análise de variância das áreas obtidas ($p > 0,05$). No entanto, devido à natureza proteica do fármaco, o controle do pH da solução utilizada como fase móvel e diluente deve ser rigoroso, pois alterações no pH podem alterar a conformação do anticorpo e alterar a interação da proteína com a coluna, causando redução da resolução entre os picos e alargamento do pico principal (Arakawa et al., 2010).

Pode-se concluir que o método analítico proposto para quantificação de BVZ na sua forma monomérica mostrou-se sensível, preciso e linear no intervalo de concentração entre 5 e 75 $\mu\text{g/mL}$, sendo adequado para a avaliação da qualidade e estabilidade do medicamento.

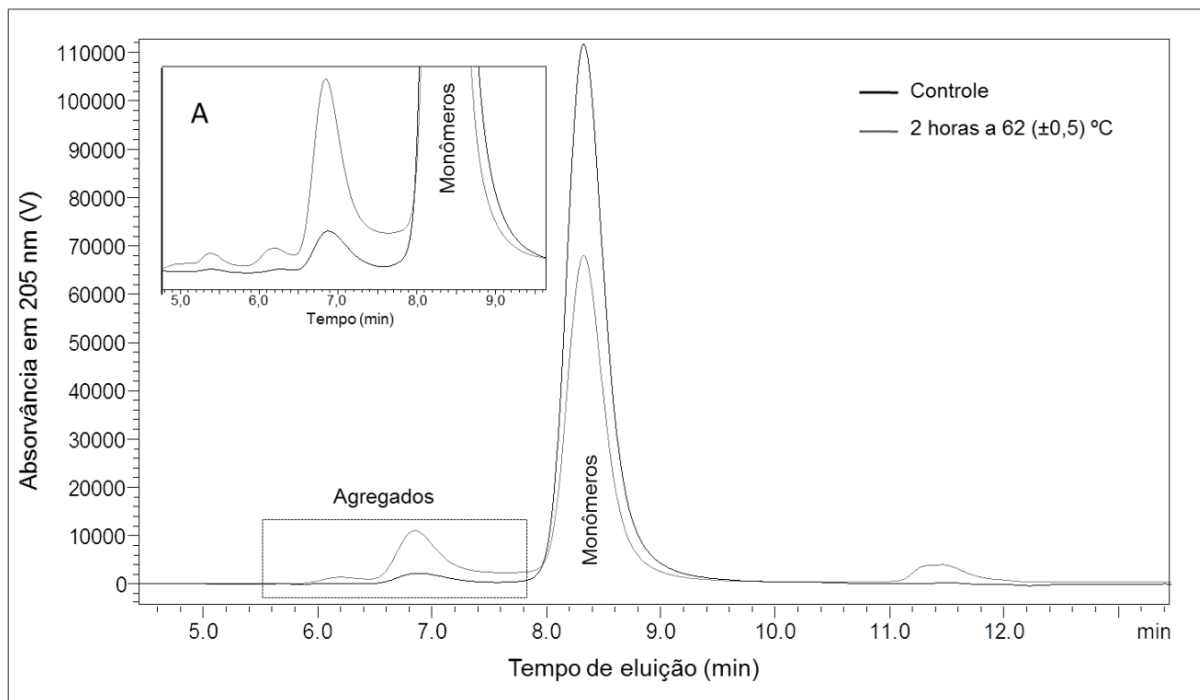
3.4.2. Análise cromatográfica do BVZ para identificação de instabilidades

Cromatografia a Líquido por Exclusão de Tamanho (CLAE-ET) é um método clássico aplicado ao estudo de proteínas para avaliação de instabilidades como fragmentação e agregação. Dessa forma, avaliamos sua aplicabilidade para a identificação de instabilidades no Avastin[®] (PAUL et al. 2012).

Para isso, investigamos se são registradas diferenças significativas entre os cromatogramas do BVZ controle e submetido a aquecimento o qual, de acordo com a literatura e com os resultados prévios da eletroforese, induz drásticas alterações na formulação proteica.

Os cromatogramas do BVZ controle e aquecido mostram um pico principal e dois picos secundários (**Figura 17**). O perfil cromatográfico das amostras aquecidas é caracterizado por redução na área do pico principal e aumento na área dos picos secundários, representativos de agregados proteicos.

Figura 17 - Sobreposição dos cromatogramas representativos do BVZ controle e submetido a aquecimento. A) Região do cromatograma ampliada para melhor visualização dos picos de agregados proteicos.



A porcentagem de cada pico individual (monômeros e agregados) em relação à área total do cromatograma foi calculada. Empregando-se as equações 4 e 5, obtiveram-se porcentagem de agregados é significativamente superior nas amostras aquecidas a 62 °C em relação controle. O aumento registrado é acompanhado pela redução na porcentagem de monômeros (**Tabela 6**).

As áreas dos picos principais das amostras controle e aquecida foram comparadas a fim de avaliar o impacto do estresse térmico sobre o conteúdo de monômeros da

amostra. Empregando-se a equação 6, observamos que o aquecimento provoca uma queda acentuada na quantidade de monômeros das amostras aquecidas a 62°C em relação ao controle, observando-se redução significativa na concentração relativa de monômeros (**Tabela 6**).

Dessa forma, identificamos que se utilizando os parâmetros cromatográficos e os cálculos matemáticos selecionados, o método desenvolvido é útil para a avaliação da qualidade e estabilidade do Avastin[®], fornecendo informações importantes sobre a composição das amostras.

Tabela 6 - Estabilidade do bevacizumabe (Avastin[®]) em condições variadas.

Temperatura/ Estresse	Duração do estresse	Concentração relativa do monômero (%) ^a	Monômeros (%)	Agregados (%) ^b
Controle	-	100,00 ± 1,76	97,85 ± 0,21	2,14 ± 0,21
40 °C	3 horas	87,60	96,89	3,0
62 °C	1 hora	63,89 ± 6,43*	87,54 ± 2,03*	12,66 ± 1,68*
62 °C	2 horas	63,55 ± 7,14*	83,33 ± 5,48*	16,67 ± 5,48*
65 °C	15 min.		Precipitação	

^aConcentração relativa do monômero = área do pico principal da amostra/área do pico principal do BVZ não estressado x 100.

^bOligômeros e agregados de alta massa molecular.

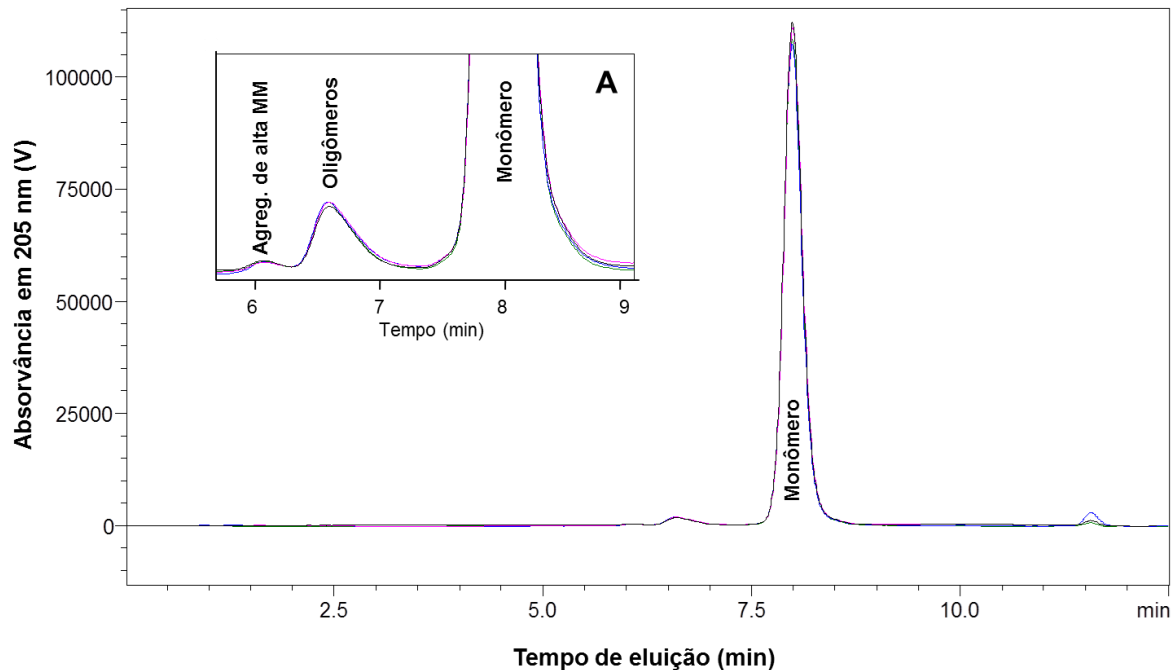
*Os valores foram considerados significativamente diferentes do controle preparado no mesmo dia da análise (*p < 0,05, **p < 0,01, t-Student).

3.4.3. Análise cromatográfica do Avastin[®] fracionado e referência

CLAE foi aplicada para fracionar e quantificar monômeros e agregados solúveis nas amostras de bevacizumabe (BVZ).

Conforme os testes preliminares e os relatos da literatura, três picos foram encontrados nos cromatogramas do Avastin[®] referência e fracionado: um pico principal correspondente ao anticorpo na sua forma monomérica e dois picos de menor tempo de retenção correspondentes a oligômeros e agregados de alta massa molecular. Nas quinze amostras analisadas, nenhum pico adicional foi encontrado e o tempo de retenção dos picos foi mantido em relação ao BVZ referência (Erro! Fonte de referência não encontrada.).

Figura 18 - Superposição dos cromatogramas representativos do Avastin® referência e fracionado. A) Região ampliada para melhor visualização dos picos de agregados proteicos.



Empregando-se as equações 4, 5 e 6, observa-se que as proporções entre monômeros, oligômeros e agregados em cada fração não se diferem das obtidas para o BVZ referência (**Tabela 7 e Figura 19**). Dessa forma, sugere-se que prática de fracionamento não alterou a quantidade nativa de oligômeros e agregados nas amostras analisadas em relação ao referência.

Tabela 7 – Composição do Avastin® referência e fracionado por CLAE.

Amostra	Concentração relativa do monômero (%) ^a	Monômeros (%) ^b	Oligômeros (%) ^b	Agregados de alta M.M. (%) ^b
Referência	100,00 ± 1,76	97,77 ± 0,07	2,05 ± 0,06	0,19 ± 0,03
FM A	103,34 ± 2,90**	97,68 ± 0,09	2,14 ± 0,10	0,17 ± 0,01
FM B	99,55 ± 3,06	97,54 ± 0,07	2,26 ± 0,07	0,20 ± 0,02
FM C	98,29 ± 4,59	97,77 ± 0,28	2,16 ± 0,08	0,14 ± 0,03

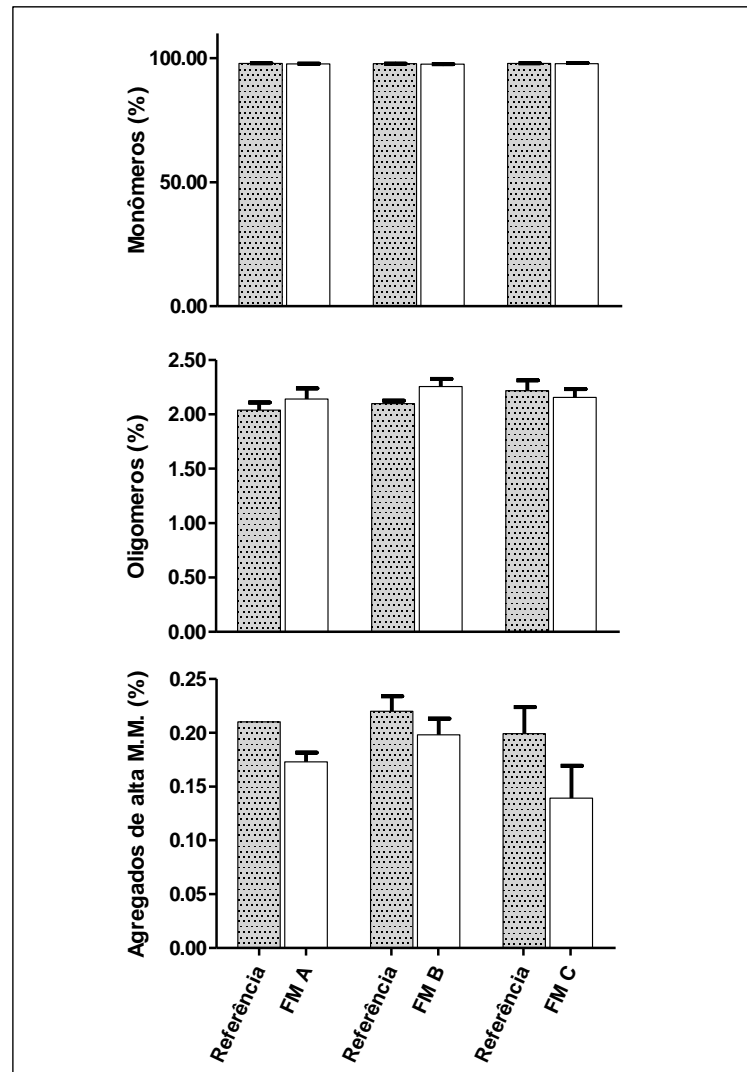
M.M. = Massa Molecular.

^a Recuperação relativa do monômero = área do pico principal da amostra/área do pico principal do Avastin® referência x 100.

^b Porcentagens de monômeros, dímeros e agregados de maior massa molecular em relação à área total dos cromatogramas.

*Os valores foram considerados significativamente diferentes do referência preparado no mesmo dia da análise (*p < 0,05, **p < 0,01, teste t não pareado).

Figura 19 – Proporção do anticorpo nas formas de monômeros, oligômeros e agregados de alta massa molecular (M.M.) Avastin® referência e fracionado; n=15.

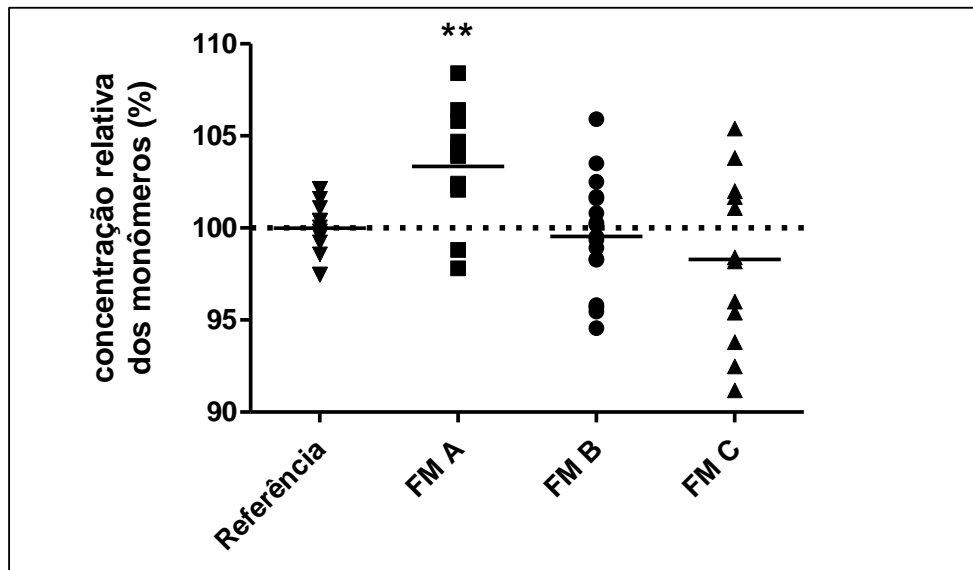


Empregando-se a equação 6, as áreas dos picos principais das amostras e do BVZ referência foram comparadas a fim de avaliar se houve perda monomérica no produto fracionado em relação ao referência, registrando-se assim, a concentração relativa do monômero (**Tabela 7**).

As concentrações relativas de monômero encontradas para cada uma das amostras estão representadas na **Figura 20**. Em relação ao referência, as farmácias A, B e C possuem, respectivamente, 103,3%, 99,6% e 98,3% de monômeros em solução. Por teste t não pareado concluímos que nenhuma das farmácias apresentou redução estatisticamente significativa na quantidade de monômeros em relação medicamento ao referência.

Para a farmácia 3, observamos que 3 das 15 frações analisadas apresentaram menos de 95% de monômeros em relação ao referênciã, observando-se frações com 91,2; 92,5% e 93,8% de monômeros representando uma redução de, respectivamente, em 9,8%; 7,5% e 6,2% em relação ao referênciã.

Figura 20 – Quantidade de monômeros nas amostras fracionadas em relação ao BVZ referênciã. Médiã representadas pelo traço cheio; n= 15.



Por meio desses dados, inferimos que a CLAE por exclusão de tamanho não indicou fragmentação ou formação de agregados subvisíveis nas frações analisadas. Os dados obtidos sugerem ainda que não houve perdas da forma monomérica por degradação do conteúdo das frações. Assim, por CLE, identificamos manutenção da estabilidade das amostras após o fracionamento.

3.5. Análise turbidimétrica

Utilizando espectrometria no UV-Vis avaliamos se a técnica é capaz de indicar a presença de partículas insolúveis e visíveis, mesmo em quantidades reduzidas, induzidas nas amostras de BVZ por aquecimento.

Nas análises sem diluição prévia, identificamos significativo aumento na densidade ótica a 350 nm na amostra aquecida em relação ao controle (**Tabela 8**). Uma vez que nesse comprimento de onda os cromóforos das proteínas têm absorção desprezível, os incrementos observados na densidade ótica em relação ao controle

podem ser atribuídos à formação de agregados insolúveis ou partículas contaminantes na formulação.

A fim de reduzir o volume de amostra requerido para a análise, avaliamos se as diferenças entre as densidades óticas das amostras controle e aquecida são mantidas após diluição de 10 vezes. Conforme na análise das amostras concentradas, identificamos significativo aumento na densidade ótica a 350 nm na amostra aquecida em relação ao controle (**Tabela 8**).

Empregando-se a equação 7, obtiveram-se as porcentagens de particulados detectáveis no BVZ aquecido. Surpreendentemente, obtiveram-se resultados idênticos para a concentração relativa de partículas visíveis das amostras com ou sem diluição prévia à análise. Em ambos os casos, o aquecimento gerou um acréscimo de 85,5% de partículas visíveis nas amostras em relação ao controle.

Tabela 8 – Opalescência do BVZ controle e aquecido a 62 °C por 2 horas. A absorvância das soluções foi medida antes e após diluição.

Condição da leitura	BVZ	Densidade Ótica (350 nm)	Partículas visíveis formadas(%)
Sem diluição	Controle	0,108 ± 0,012	85,5%
	Aquecido	0,743 ± 0,002	
Diluição de 10 vezes	Controle	0,012 ± 0,002	85,5%
	Aquecido	0,079 ± 0,001	

Concluimos portanto, que por espectrometria na região do UV é possível identificar a presença de partículas visíveis em solução, observando-se alterações na densidade ótica das amostras mesmo após diluição das mesmas. Portanto, o método será empregado na avaliação da qualidade do Avastin[®] fracionado adotando-se diluição prévia das amostras em 10 vezes, o que permitirá a utilização de um volume reduzido do medicamento para avaliação da opalescência, sem perda da sensibilidade do método.

Estão descritas na **tabela 9** as densidades óticas médias obtidas para as amostras e para o Avastin[®] referência durante o estudo da qualidade do medicamento fracionado. As densidades óticas das doses unitárias não foram significativamente superiores às obtidas para BVZ referência. Dessa forma, por análise no UV-Vis não

identificamos alterações nas absorptividades das amostras que indiquem contaminação das amostras por partículas visíveis.

Tabela 9 – Densidades óticas em 350 nm de amostras do Avastin[®] referência e fracionado; n=3.

Amostra	Absorbância (A₃₅₀)
Referência	0,011 ± 0,001
FM A	0,014 ± 0,004
FM B	0,015 ± 0,007
FM C	0,012 ± 0,005

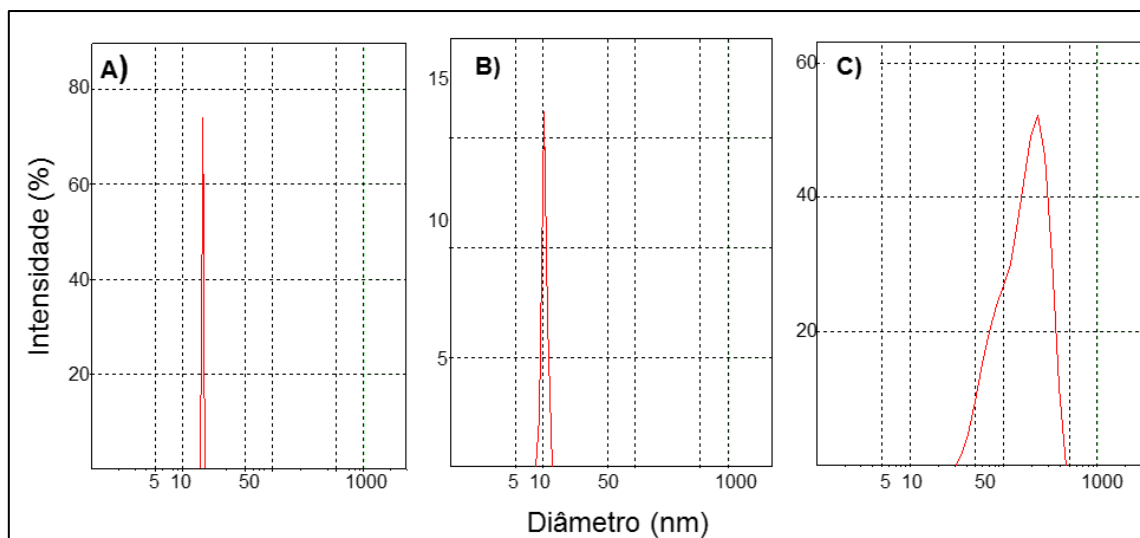
3.6. Espalhamento da Luz Dinâmico (DLS)

O espalhamento da luz dinâmico (DLS, *dynamic light scattering*) é usualmente aplicado para detecção de partículas proteicas na faixa de nanômetros que se formam no início do processo de agregação (HAWE *et al.*, 2009; MAHLER *et al.*, 2005).

Nos gráficos de distribuição de tamanho do Avastin[®] obtidos por DLS, observamos um único pico em torno de 10 nm (**Figura 21.a**), em conformidade com o observado por outros autores. De acordo com dados da literatura, picos observados entre 10 e 12 nm podem ser atribuídos aos monômeros e dímeros da imunoglobulina (PAUL *et al.*, 2012).

Uma vez que o método requer grande volume de amostra, avaliamos o efeito da diluição do medicamento comparando os resultados obtidos para o Avastin[®] com e sem diluição prévia. Para ambos obtivemos apenas um pico em torno de 10 nm (**Figura 21.a-b**) e tamanhos hidrodinâmicos médios de, respectivamente, 15 e 10 nm. Dessa forma, identificamos que a concentração e tampão adotados na diluição não alteram significativamente o resultado da análise, havendo apenas sutil diferença no tamanho médio das partículas nas amostras diluída e não-diluída.

Figura 21 – Distribuição de tamanho do Avastin® (A) controle sem diluição, (B) controle diluído a 2,6 mg/mL e (C) submetido a aquecimento.



O aquecimento do Avastin® gera o desaparecimento do pico principal em torno de 10nm e o surgimento de um pico largo entre 40 e 500 nm(**Figura 13.c**). Adicionalmente, o tamanho hidrodinâmico médio da amostra submetida ao aquecimento é registrado em torno de 127 nm, cerca de 100 vezes superior ao encontrado para o BVZ controle. Picos observados em faixas maiores de tamanho, conforme o observado para o BVZ aquecido, podem ser atribuídos às formas agregadas da proteína.

Assim, identificamos que com a concentração e tampão de diluição adotados na diluição, é possível observar diferença significativa no espalhamento de luz da amostra aquecida em relação ao controle. Essa observação sugere que a diluição das amostras em tampão fosfato (pH 6,2; 51 mM), na concentração 2,6 mg/mL, não mascara as instabilidades induzidas na formulação e, portanto, pode ser adequadamente aplicada para investigação de agregados nanométricos no Avastin® fracionado por DLS.

No estudo da qualidade do medicamento fracionado os gráficos de distribuição de tamanho gerados para o Avastin® referência e fracionado foram similares e apresentaram um único pico em torno de 10 nm (**Figura 22**). Os tamanhos médios das moléculas das amostras foram registrados entre 10 e 12 nm (**Tabela 10**).

A ausência de picos secundários na análise gráfica e a manutenção do tamanho médio das moléculas das amostras fracionadas em relação ao referência sugere que não houve a formação de agregados ou contaminação das amostras fracionadas com particulados na faixa nanométrica.

Figura 22 – Gráficos representativos da distribuição de tamanho por DLS (A) do Avastin® referência (B-D) amostras do fracionamento realizado, respectivamente, pelas farmácias A, B e C.

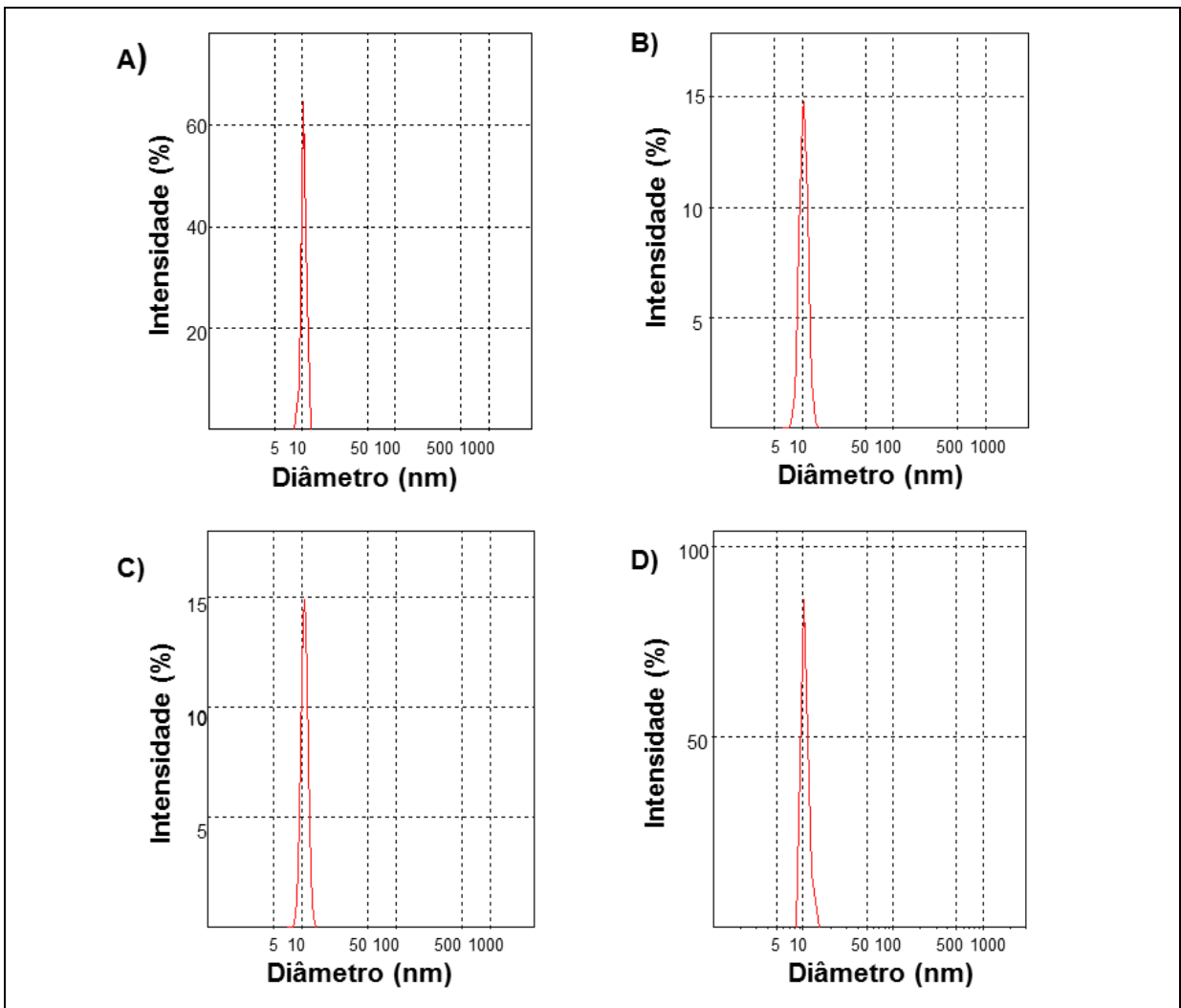


Tabela 10 – Sumário dos resultados obtidos por DLS para o Avastin® referência e fracionado.

Amostra	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão	Diâmetro do pico (nm)	Intensidade relativa (%)
Referência	10,64	0,06	10,3	100
FM A	10,45 ± 0,06	0,05 ± 0,057	10,9 ± 0,56	100
FM B	10,68 ± 0,05	0,091 ± 0,046	11,01 ± 0,34	100
FM C	11,49 ± 0,36	0,17 ± 0,07	10,2 ± 0,40	100

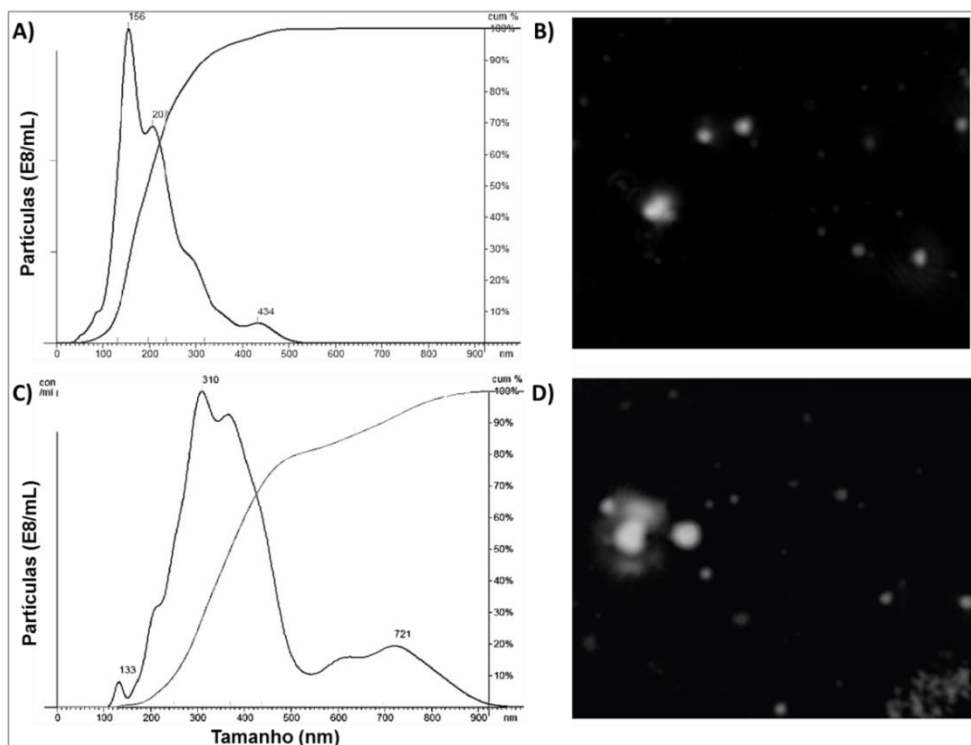
3.7. Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

Os principais resultados obtidos por NTA são o tamanho médio das moléculas, a distribuição do tamanho das partículas em solução e vídeos que registram o movimento individual das partículas e que, portanto, fornecem informações sobre suas características.

Utilizando os parâmetros selecionados observou-se repetibilidade do tamanho médio registrado. Para as três soluções de BVZ preparadas obteve-se tamanho médio bastante próximos: 213 ± 78 nm; $220 \pm 9,89$ nm e 219 ± 71 nm. A repetibilidade também foi observada para as modas (tamanho mais frequente) registradas: 78, 93 e 71 nm.

Após 5 minutos de aquecimento do BVZ na própria câmara de injeção do equipamento, o perfil de distribuição de tamanho da amostra alterou-se significativamente, aumentando o tamanho médio das partículas de 213 ± 78 nm para 413 ± 160 nm. Paralelamente, passou-se a observar partículas de tamanho superior nos vídeos capturados (**Figura 23**).

Figura 23 – Distribuição de tamanho de partículas e fotografias capturadas obtidas por NTA (A- B) BVZ controle e (C-D) BVZ aquecido por 5 minutos a 55 °C.



Em geral, os resultados obtidos por DLS e NTA para uma mesma amostra tendem a diferir significativamente. Devido ao baixo índice de refração das proteínas, o limite inferior de detecção do NTA é de aproximadamente 30 nm, o que significa que monômeros proteicos (3-10 nm) não são detectados por essa técnica sendo consideradas apenas as partículas de maior tamanho para o cálculo do tamanho médio (FILIPE *et al.*, 2010).

Com base nisso, consideramos o NTA um método complementar ao DLS, adequado para investigação de instabilidades no BVZ fracionado, sendo útil para investigação de agregados e partículas provenientes de degradação e contaminação das amostras.

Na análise da qualidade do medicamento após fracionamento, todos os tamanhos médios e moda (valor mais frequente) obtidos para o Avastin[®] fracionado foram inferiores ao obtidos para o medicamento referência (**Tabela 11**). Em nenhuma das amostras das três farmácias foi observado tamanho médio de partículas superior ao referência, o que pode ser facilmente visualizado no gráfico de distribuição de tamanhos (**Figura 24** Erro! Fonte de referência não encontrada.).

Adicionalmente, os vídeos gerados foram analisados investigando-se diferenças no tamanho e na estrutura das partículas rastreadas pelo *software* durante as análises do Avastin[®] fracionado e referência. Observamos grande semelhança entre os vídeos o que evidencia a manutenção das características da formulação após o fracionamento.

Dessa forma, complementando o resultado obtido por DLS, inferimos que o fracionamento do medicamento não induziu alterações nas amostras analisadas em relação ao referência não sendo registradas formação de agregados ou contaminação com particulados na faixa nanométrica.

Figura 24 – Distribuição de tamanhos de partículas no Avastin® fracionado e referência por NTA.

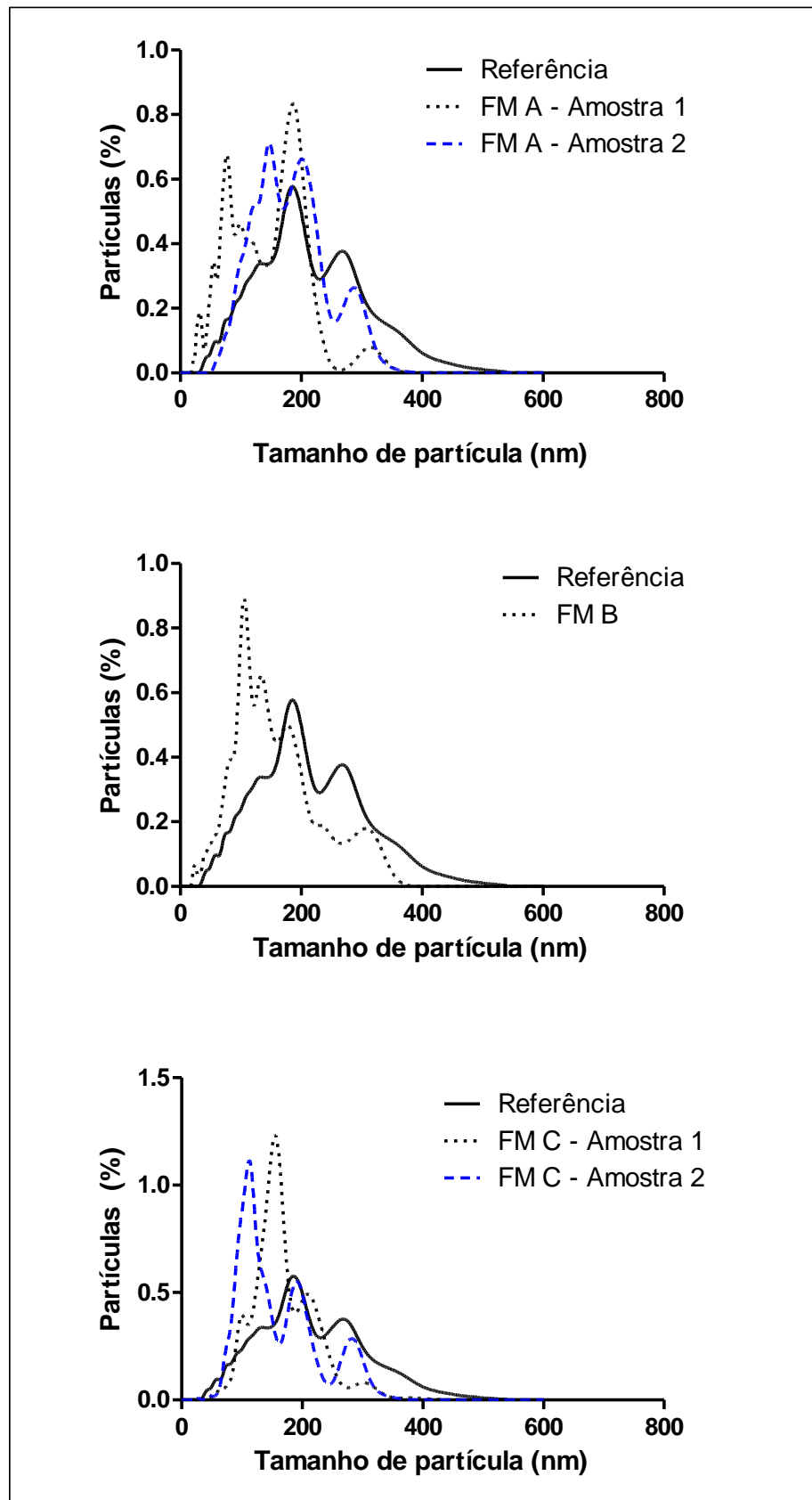


Tabela 11– Tamanho Médio (nm) e o desvio padrão obtido por NTA; n=2

Amostra		Tamanho (nm)	Moda (nm)
Referência		220 ± 93	185
FM A	Amostra 1	189 ± 194	187
	Amostra 2	185 ± 60	147
FM B	Amostra 1	163 ± 72	106
FM C	Amostra 1	171 ± 52	155
	Amostra 2	161 ± 65	112

3.8. Espectrometria de Massa

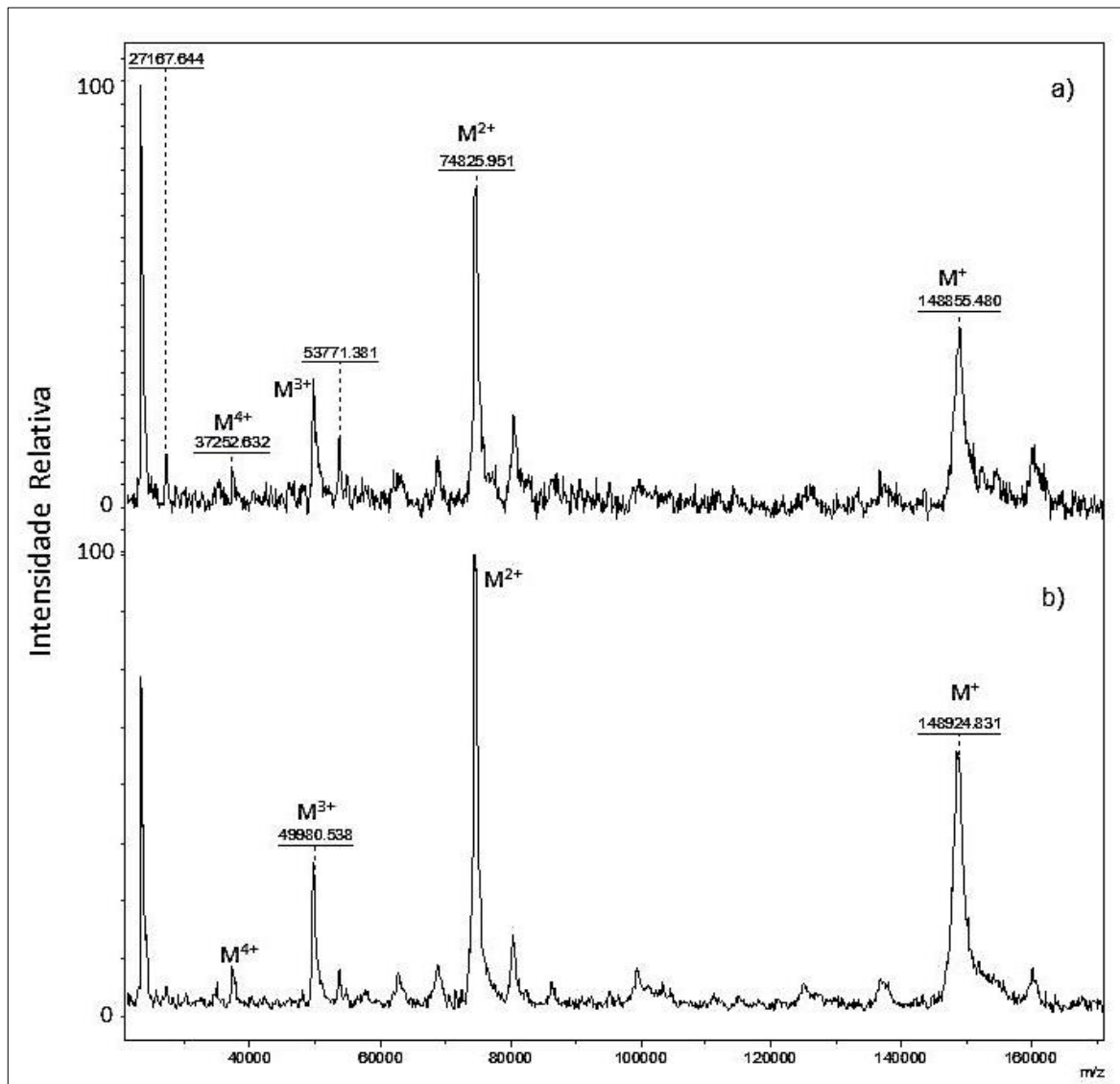
Por EM de Ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF), obtivemos para o Avastin[®] espectro de massa contendo íons de relação massa/carga (m/c) tipicamente encontrados em anticorpos (**Figura 25a**) (ALEXANDER & HUGHES, 1995; CHEN *et al.*, 2009)

O anticorpo foi detectado como íons mono (M^+) e duplamente carregado (M^{2+}) de relação m/c de, respectivamente, 148.855 e 74.825. Adicionalmente foram encontrados íons contendo 3 e 4 cargas (M^{3+} e M^{4+}) e com relação m/c igual a, respectivamente, 49.601 e 37.252. Sinais proteicos de menor massa carga também foram detectados (**Figura 25a**).

Para a amostra de Avastin[®] submetida a aquecimento (**Figura 25b**), obteve-se espectro de massa semelhante ao obtido para a amostra não aquecida. Comparando-se as intensidades dos íons, não se observou redução na intensidade relativa dos sinais iônicos representativos do anticorpo de carga $M^{+,2+,3+}$ ou $4+$. Paralelamente, não foram observados íons adicionais ou incremento na intensidade de íons relativos a fragmentos de anticorpos.

Uma vez que não foi detectada diferença entre os espectros de massa do controle e da amostra submetida a condições drásticas de temperatura, a metodologia foi desconsiderada para a avaliação da qualidade do Avastin[®] fracionado.

Figura 25- Espectros de massa do BVZ (a) controle e (b) aquecido por 2 horas a 62 °C.



3.9. Avaliação da eficácia do BVZ por ELISA indireto

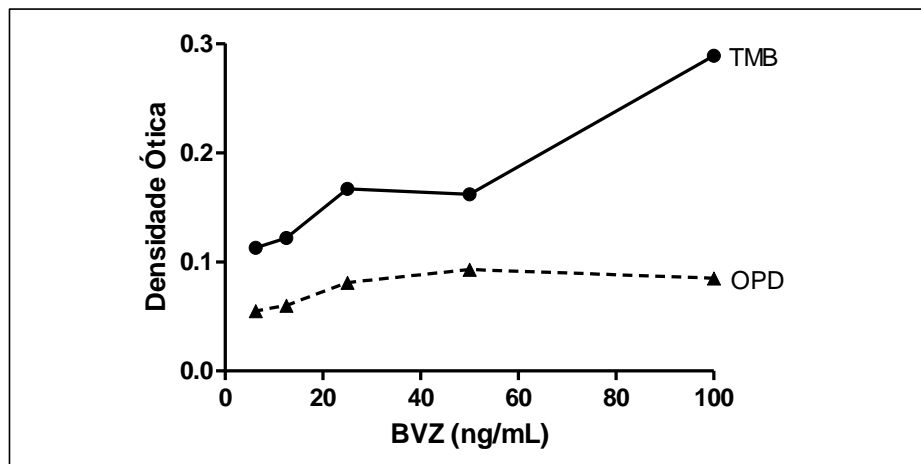
A fim de avaliar a atividade biológica do Avastin[®] fracionado, buscamos desenvolver e validar um ensaio imunoenzimático baseado na interação do anticorpo com seu antígeno.

Com base na literatura (**Tabela 12**), inicialmente adotamos para construção da curva de calibração concentrações de BVZ entre 6,25 e 100 ng/mL e incubação das amostras por 2 horas à t.a. sobre os poços previamente sensibilizados com VEGF (KAKINOKI *et al.*, 2012; OLSEN *et al.*, 2011; SINAPIS *et al.*, 2011).

No ensaio inicial, avaliamos a viabilidade da tetrametilbenzidina (TMB) e do ortofenilenodiamina (OPD) como substratos enzimáticos, utilizando o anticorpo conjugado a 0,02% v/v (1:5000).

Empregando-se o OPD, foram registradas densidades óticas baixas (abaixo de 0,1) e sem aumentos proporcionais às concentrações crescentes de BVZ. Empregando-se o TMB obteve-se um perfil mais adequado, com crescentes densidades óticas, sem se obter, no entanto, uma curva com coeficiente de regressão linear adequado ($r^2 = 0,93$) (Figura 26).

Figura 26 – Ensaio imunoenzimático empregando-se TMB e OPD como substratos enzimáticos e anticorpo conjugado a 0,02% (1:5.000).



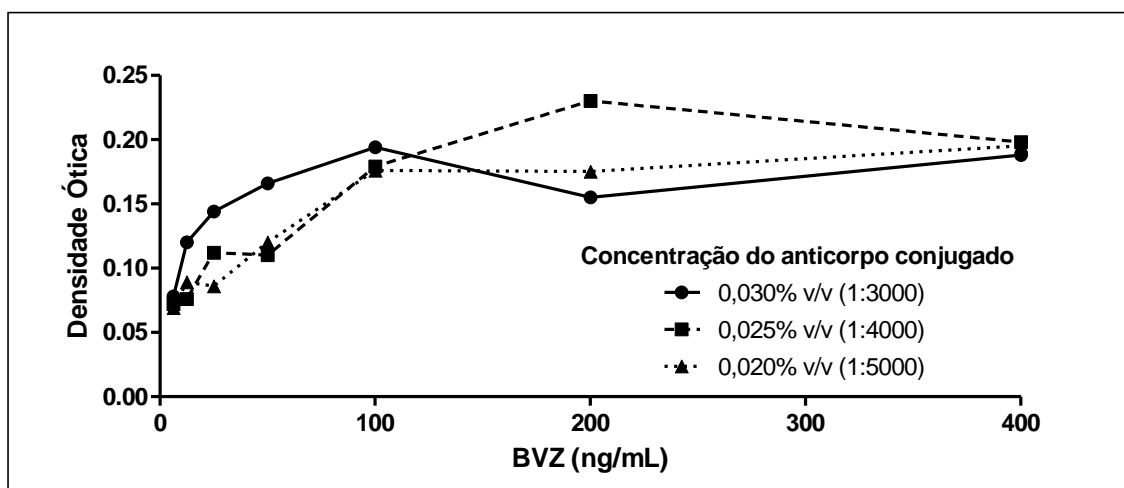
Após ser verificada uma melhor sensibilidade do sistema na presença de TMB, buscou-se aperfeiçoar os resultados variando a concentração do anticorpo conjugado e mantendo o TMB como substrato enzimático. Para isso, repetimos o ensaio anterior utilizando o anticorpo conjugado nas concentrações 0,02%, 0,025% e 0,03% v/v (diluídos, respectivamente, nas proporções 1:5.000 1:4.000 1:3.000 v/v). Adicionalmente, ampliamos a faixa de concentrações da amostra de 6,25 a 100 ng/mL para 6,25 a 400 ng/mL pela adição de dois pontos extras de maior concentração para construção da curva.

No entanto, o emprego do anticorpo conjugado em maiores concentrações não gerou aumento significativo nas densidades óticas mantendo-se discretas as diferenças entre as densidades óticas dos pontos de concentrações crescentes de BVZ. Além disso, observou-se uma região de equivalência a partir de 100 ng/mL,

visualizada no gráfico como um patamar formado pelos três últimos pontos da curva. Por análise de variâncias (ANOVA) não foi identificada diferença estatisticamente significativa entre as curvas correspondentes a cada concentração de anticorpo conjugado (**Figura 27**).

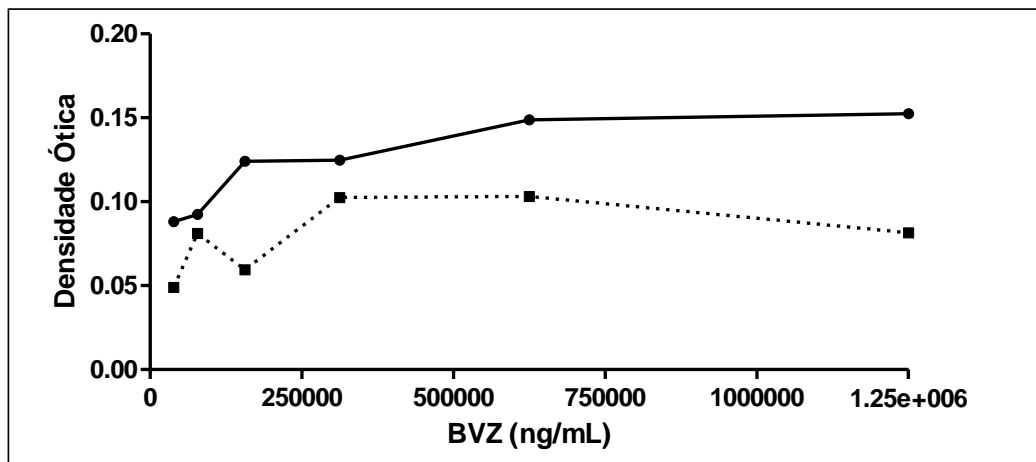
Buscando-se um sistema que gerasse densidades óticas maiores e proporcionais à concentração da amostra, aumentaram-se as concentrações de BVZ empregadas no ensaio de 6,25 a 100 ng/mL para 9.760 a 1.250.000 ng/mL. Com base nos resultados prévios, adotou-se o anticorpo conjugado na concentração 0,03% v/v (1:3000) e TMB como substrato enzimático.

Figura 27 – Ensaio imunoenzimático comparando o efeito do anticorpo conjugado nas concentrações 0,02% (1:5000), 0,025% (1:4000) e 0,030% (1:3000) empregando-se TMB como substrato.



Ao contrário do esperado, o aumento nas concentrações de BVZ não gerou aumento nas absorções, obtendo-se densidades óticas demasiadamente baixas e com discretas diferenças entre os pontos (**Figura 28**).

Figura 28 - Ensaio imunoenzimático realizado em três dias consecutivos empregando-se BVZ em altas concentrações (9.760-1.250.000 ng/mL), anticorpo conjugado a 0,030% v/v (1:3000) e TMB como substrato. n=3 para cada ponto das curvas.

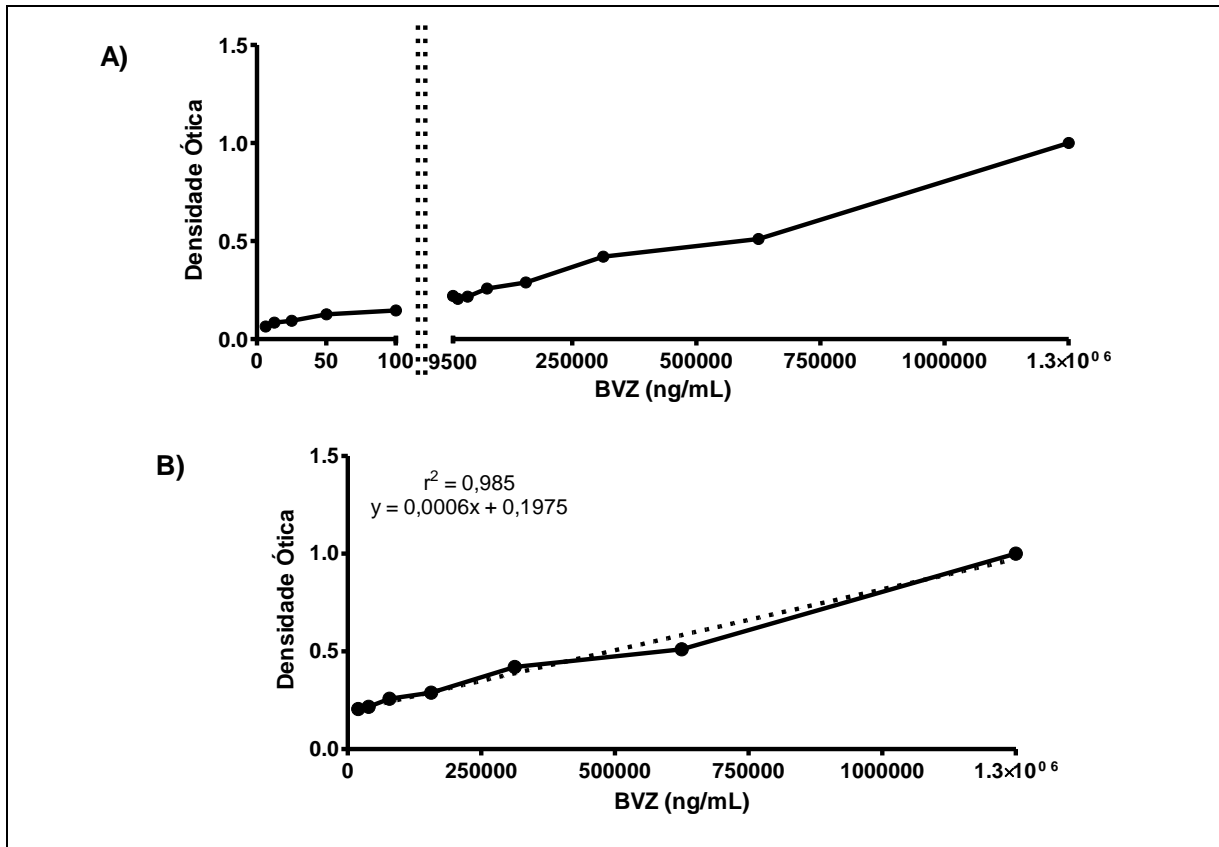


A fim de ampliar a interação entre o antígeno e o BVZ, aumentou-se o tempo de incubação da amostra de 2 para 3 horas, mantendo-se a reação em temperatura ambiente. Empregou-se no ensaio BVZ em concentrações baixas (6,25-100 ng/mL) e altas (9.760-1.250.000 ng/mL), anticorpo conjugado a 0,03% v/v (1:3000) e TMB como substrato enzimático.

Ao aumentar o tempo de incubação da amostra, as densidades óticas mantiveram-se baixas para as concentrações até 100 ng/mL e acompanhadas de uma mínima variação entre os pontos, conforme o já observado nos ensaios anteriores. Na faixa de maiores concentrações de BVZ foram alcançados melhores resultados, obtendo-se densidades óticas significativamente maiores, proporcionais às concentrações crescentes da amostra e obtendo-se coeficiente de regressão linear (r^2) de 0,985 na análise matemática dos dados (**Figura 29**).

Diante dos resultados obtidos, optou-se pela continuidade dos ensaios empregando-se amostras em altas concentrações (9.750-1.250.000 ng/mL) e mantendo-se a incubação das amostras por 3 horas à t.a., o anticorpo conjugado a 0,030% v/v e o TMB como substrato enzimático. A fim de avaliar a reprodutibilidade do resultado anterior, procedeu-se com dois novos ensaios (ensaios 2 e 3) em dias consecutivos.

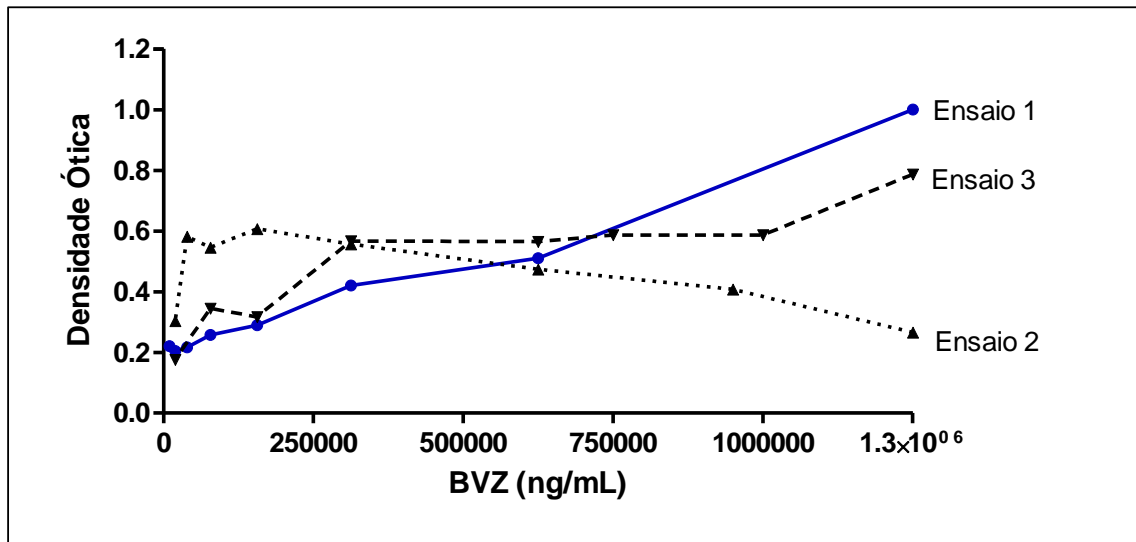
Figura 29 – A) Ensaio imunoenzimático realizado em concentrações baixas (6,25-100 ng/mL) e altas (9,75-125.000 ng/mL) de BVZ empregando-se, anticorpo conjugado a 0,03% v/v (1:3000) e TMB como substrato enzimático. B) Regressão linear realizada a partir dos pontos de maior concentração.



No entanto, apesar de mantidos os parâmetros pré-estabelecidos, não houve concordância entre os resultados obtendo-se, nos ensaios seguintes, rápida saturação da curva, formação de regiões de equivalência (visualizadas graficamente como um patamar) e uma acentuada região de decaimento em um dos ensaio (**Figura 30**).

Diante dos problemas de reatividade do ensaio (baixas densidades óticas) seguidos de baixa seletividade (densidades óticas não proporcionais às concentrações da amostra) buscamos reavaliar as concentrações de amostra adequadas ao sistema proposto. Para isso, procedemos com novo ensaio empregando-se BVZ em concentrações baixas (6,25-200 ng/mL) e altas (25.000-600.000 ng/mL) e TMB como substrato.

Figura 30 - Ensaios imunoenzimáticos realizados em dias consecutivos para avaliação da reprodutibilidade do método proposto. Empregou-se anticorpo conjugado a 0,03% v/v (1:3000) e TMB como substrato enzimático.

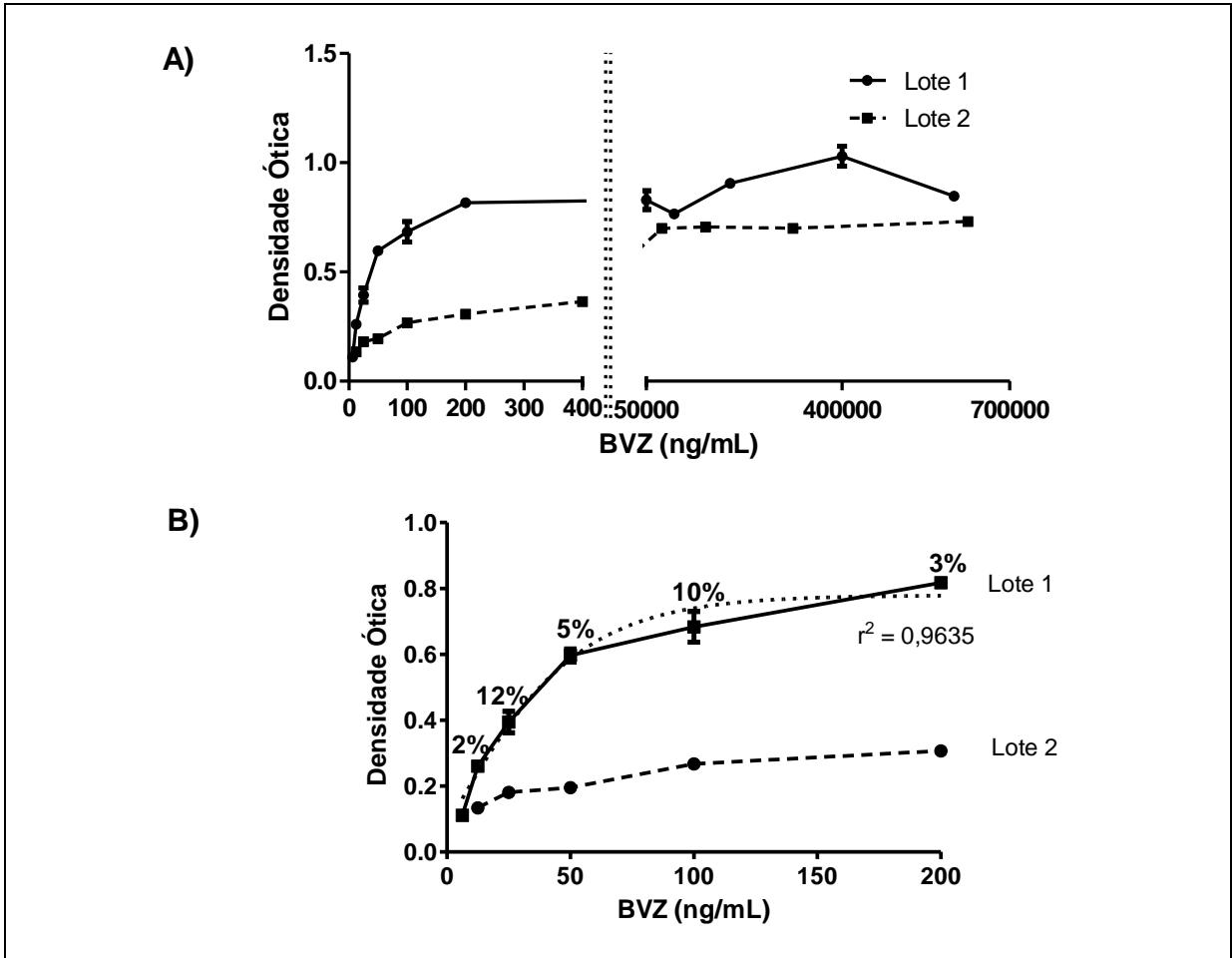


Para fins comparativos e buscando uma reação colorimétrica mais controlada nos pontos de maior concentração de BVZ, testaram-se dois lotes do anticorpos conjugado à peroxidase (lote 1, usado nos ensaios prévios e lote 2, recentemente adquirido).

No ensaio empregando o anticorpo conjugado do primeiro lote (lote 1), novamente observou-se uma região de equivalência na faixa de maior concentração, caracterizado graficamente por um patamar a partir de 25.000 ng/mL de BVZ (**Figura 31a**). Uma melhor gradação entre as densidades óticas foi observada entre 6,25 e 200 ng/mL de BVZ. Utilizando-se os valores de absorbância para os pontos de menor concentração e aplicando-se um modelo de regressão não linear do tipo 5 parâmetros logarítmicos, obteve-se uma curva com coeficiente de correlação igual a 0,96 (**Figura 31b**).

Empregando o anticorpo conjugado do segundo lote (lote 2) obtiveram-se resultados menos favoráveis. Nos pontos de menor concentração (12,5 a 400 ng/mL) o sistema mostrou-se menos sensível na presença do novo conjugado, e não houve a gradação colorimétrica esperada entre as diferentes concentrações de BVZ. Paralelamente, nos pontos de maior concentração, formou-se uma região de equivalência observando-se um patamar no gráfico acima de 50.000 ng/mL (**Figura 31a**).

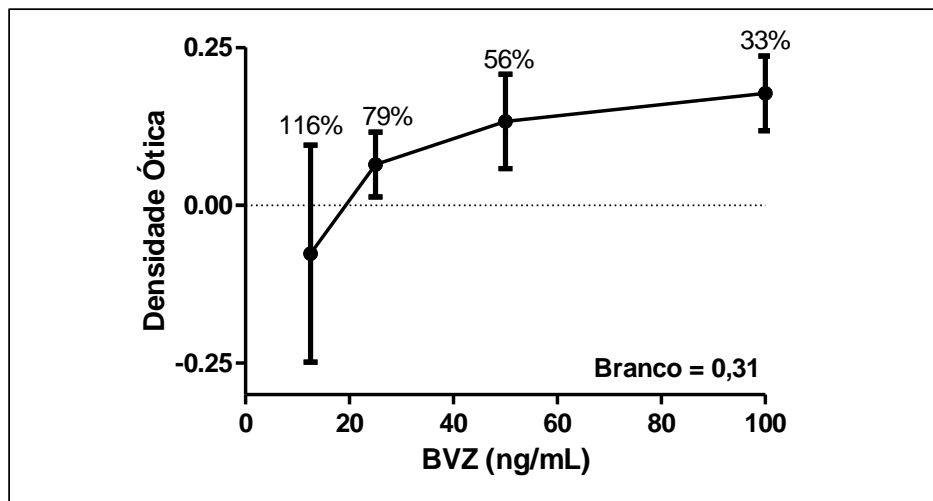
Figura 31 – (A) Ensaio imunoenzimático realizado em concentrações baixas (6,25-200 ng/mL) e altas (25-200.000 ng/mL) de BVZ comparando-se anticorpos conjugados a peroxidase de dois fornecedores. Emprego de anticorpo conjugado a 0,03% (1:3000) e TMB como substrato. (B) regressão não linear dos pontos da região de menor concentração.



Uma vez que o sistema mostrou-se inespecífico na presença de altas concentrações de BVZ, direcionaram-se os ensaios seguinte para a região de baixa concentração da amostra. A fim de avaliar a reprodutibilidade do resultado obtido com o conjugado 1 no ensaio anterior, repetimos a reação imunoenzimática empregando BVZ em baixas concentrações aplicado em triplicata na placa. Manteve-se o conjugado a 0,03% e TMB como substrato.

Apesar de mantidos os parâmetros em relação ao ensaio anterior, não se obteve uma curva densidade adequadas, observando-se, ainda, grande variância entre as replicatas (33% a 116% de variância) (**Figura 32**).

Figura 32 – Ensaio imunoenzimático realizado em concentrações baixas (6,25-200 ng/mL) de BVZ, anticorpo conjugado a 0,03% (1:3000) e TMB como substrato.



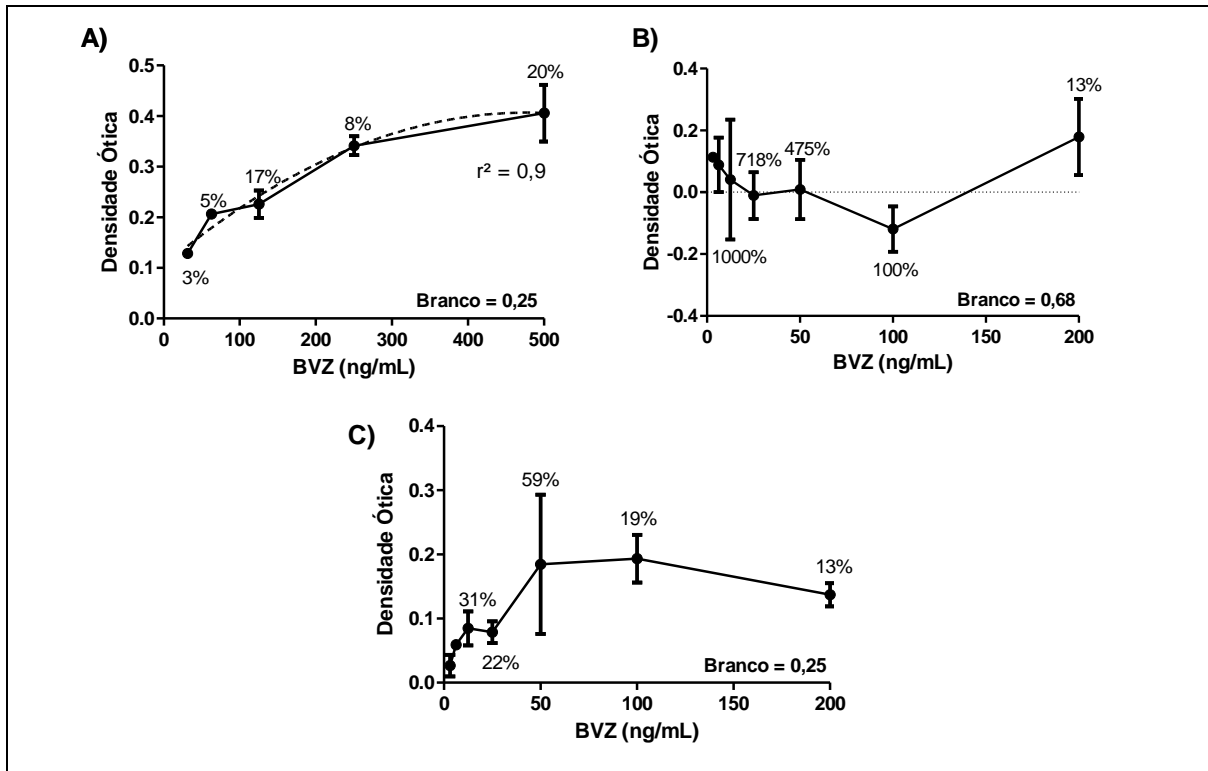
Diante das altas variâncias entre os pontos, avaliamos se os problemas detectados decorriam da degradação do antígeno empregado na sensibilização. Para isso, VEGF₁₆₅ de outro fabricante (R&D systems), recém adquirido, foi empregado nos ensaios imunoenzimáticos seguintes.

Novamente, obtiveram-se resultados irreprodutíveis, destacando-se a alta variância entre as replicatas de cada concentração, baixas densidades óticas e alta absorvidade na ausência de BVZ (branco) (**Figura 33 a-b**).

Por fim, a fim de investigar se as altas variâncias obtidas relacionam-se com a placa utilizada nos ensaios, avaliou-se o mesmo sistema utilizando-se placa de outro lote do mesmo fabricante (costar®). No entanto, novamente observaram-se as baixas densidades óticas acompanhadas de grande variância entre as replicatas (**Figura 33c**).

Em resumo, sugere-se que o sistema proposto possui uma estreita faixa de proporcionalidade entre a concentração da amostra e as densidades óticas geradas no ensaio. Para a maioria dos ensaios, em baixas concentrações de BVZ obtêm-se baixas densidades óticas e em altas concentrações depara-se com densidades óticas equivalentes, formando um patamar gráfico. Em alguns casos, foi registrado decaimento da densidade ótica com o aumento da concentração.

Figura 33 - Ensaio imunoenzimático de BVZ em baixas concentrações (6,5 – 500 ng/mL) alterando-se, em relação aos ensaios anteriores, o fornecedor do VEGF. C) Teste empregando placa de outro lote. Ensaios realizados na mesma semana, empregando-se anticorpo conjugado a 0,03% (1:3.000) e TMB.



Na tentativa de desenvolver um sistema baseado na interação entre o BVZ e seu antígeno, adotamos uma abordagem consolidada na literatura fundamentada em um ensaio imunoenzimático do tipo indireto. Os ensaios descritos para estudo do BVZ variam amplamente em relação (**Tabela 12**):

- à quantidade de VEGF₁₆₅ aplicado para sensibilização dos poços;
- às concentrações de bevacizumabe utilizadas na construção da curva de calibração;
- ao anticorpo de detecção e substrato enzimático empregados.

Diante dos problemas de repetitividade, sensibilidade e seletividade e na tentativa de se desenvolver um sistema reprodutível realizamos diversos ensaios alterando os parâmetros:

- Lote da microplaca e da amostra;
- concentração e tempo de incubação da amostra;
- concentração e lote do anticorpo conjugado;

- substrato enzimático.

Dentre esses parâmetros, não nos foi possível alterar a quantidade de VEGF₁₆₅ usado na sensibilização das placas uma vez que seu alto custo (cerca de R\$ 1.400,00 a cada 10 µg da proteína) inviabiliza a sensibilização das placas com grande quantidade de antígeno, conforme o realizado por Bock *et al.* (2007).

Diante do insucesso em desenvolver um ensaio imunoenzimático do tipo indireto para quantificação do BVZ, buscamos outra proposta metodológica para avaliar a eficácia do Avastin[®] fracionado.

Tabela 12 – Parâmetros empregados por diferentes autores na análise da atividade biológica do BVZ por ELISA indireto.

Referência	VEGF ₁₆₅ (µg/poço)	Anticorpo de Detecção*	Substrato	Faixa de concentração do BVZ para construção da curva de calibração (ng/mL)
Olsen <i>et al.</i> , 2011	0,01	Anti-IgG conjugado a peroxidase	SQ	0,016 – 1,0
Varshochian <i>et al.</i> , 2013	0,0125	Anti-IgG biotilado	TMB	2,5 - 80
Ternant <i>et al.</i> , 2010	0,015	Anti-IgG conjugado a peroxidase	OPD	10,0 – 250.000
Sinapis <i>et al.</i> , 2011	0,02	Anti-IgG conjugado a peroxidase	ABTS	5,0 – 100
Sinapis <i>et al.</i> , 2011	0,02	Anti-IgG conjugado a fosfatase alcalina	NADPH reduzido	0,01 – 5,0
Olsen <i>et al.</i> , 2011	0,05	Anti-IgG conjugado a peroxidase	TMB	0,16 – 10,0
Bakiri <i>et al.</i> , 2006	0,1	Anti-IgG conjugado a éster acridínio	CTAC	0,0625 – 4,0
Kakinoki <i>et al.</i> , 2012	0,1	Anti-IgG conjugado a peroxidase	TMB	0,0078 - 1,0
Miyak <i>et al.</i> , 2010	0,1	Anti-IgG conjugado a peroxidase	TMB	0,0156 – 1,0
Sato <i>et al.</i> , 2012	0,1	Anti-IgG conjugado a peroxidase	PNPP	1,0 – 5.000
Zhu <i>et al.</i> , 2008	0,1	Anti-IgG biotilado	TMB	0,0156 – 1,0
Bock <i>et al.</i> , 2007	0,5	Anti-IgG conjugado a peroxidase	TMB	0,05 – 5.000

ABTS, Ácido Etilbenzotialino Sulfônico; CTAC, Cloreto de Cetilmetilamônio; TMB, Tetrametilbenzidina; OPD, Ortofenilenodiamina; SQ, Substrato Quimioluminescente.

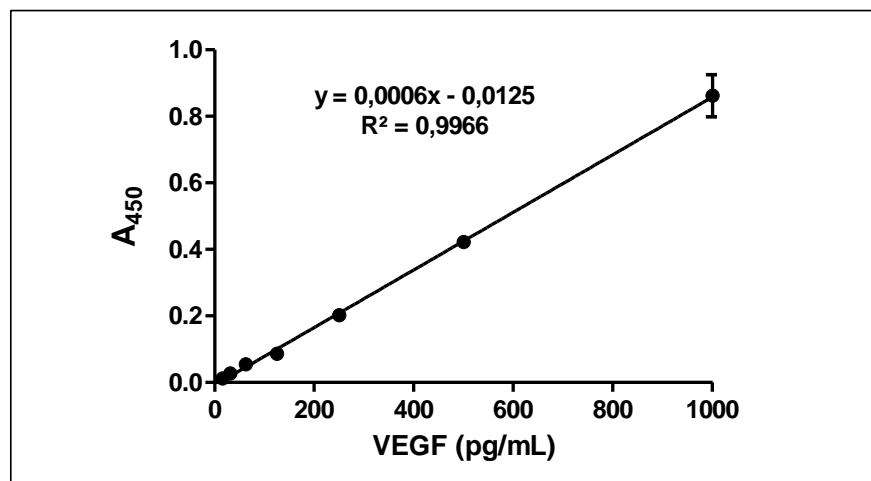
* Anticorpos anti-IgG humana

3.10. Avaliação da eficácia do BVZ por reação com seu ligante biológico

Para comparação da atividade biológica do BVZ presente no medicamento referência e fracionado, promovemos a reação do anticorpo com seu ligante biológico, o VEGF.

Utilizando-se a curva de calibração representada na **figura 34**, obteve-se a quantidade de VEGF₁₆₅ consumido pelo BVZ em cada reação (**Tabela 13**).

Figura 34 – Curva de calibração obtida no kit de ELISA Quantikine® e utilizada para quantificação do VEGF_{residual}.



O VEGF₁₆₅ usado como controle apresentou concentração de $248,05 \pm 0,41$ pg/mL ao final da reação, representando uma perda de $1,95 \pm 0,41\%$. Assim, consideramos que os valores de VEGF_{consumido} obtidos para as amostras e para o referência decorrem principalmente da ligação do BVZ ao seu antígeno, sendo que a degradação do antígeno durante a reação gera baixo impacto sobre os valores finais obtidos.

Empregando-se as equações 1 e 8 obteve-se eficiência relativa média de $97,5 \pm 5,4\%$ para as frações da farmácia A; $98,7 \pm 5,4\%$ para a farmácia B e $98,1 \pm 6,4\%$ para a farmácia C. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as quantidades de VEGF consumida em cada reação e, portanto, as eficácias dos anticorpos nos medicamentos referência e fracionado foram consideradas idênticas.

Conseqüentemente, a atividade biológica do BVZ, calculada como a eficiência do BVZ fracionado em relação ao referência, foi semelhante entre todas as frações analisadas (**Figura 35**).

Figura 35 – Atividade biológica do BVZ calculada como a eficiência de ligação do anticorpo ao VEGF₁₆₅ no Avastin® fracionado em relação ao referência; média \pm DP. Farmácias A e C, n=4; Farmácia B, n=2.

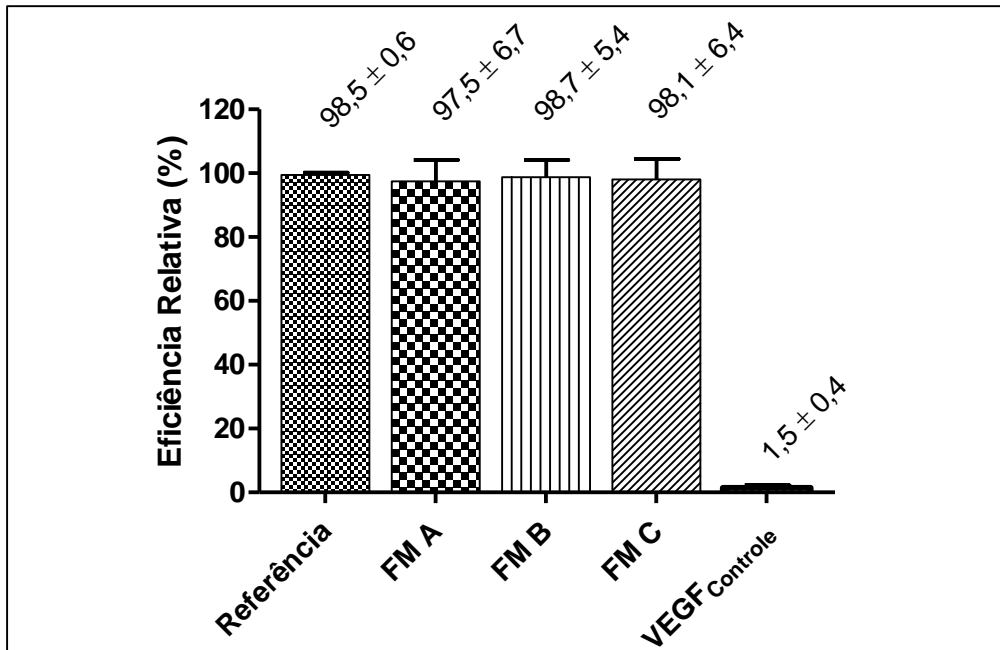


Tabela 13 – Análise da estabilidade biológica de frações de bevacizumabe (Avastin®) fracionado em farmácias de manipulação. Concentrações médias de VEGF₁₆₅ e eficiência do bevacizumabe (Avastin®) em misturas BVZ-VEGF₁₆₅ após 3 horas de reação. O ensaio foi realizado em dois momentos diferentes, sendo o referênciado analisado conjuntamente com as amostras em cada um deles.

Amostra ^a	VEGF ₁₆₅ Inicial (pg/mL)	BVZ Inicial (ng/mL)	VEGF ₁₆₅ Residual ± DP (pg/mL) ^a	VEGF ₁₆₅ consumido ± DP (pg/mL) ^a	VEGF ₁₆₅ consumido pelo BVZ (%) ^a	Eficiência Relativa do BVZ (%) ^a	
	A	B	C	D = A - C	E = D/250	-	
Ensaio 1	VEGF_{Controle}	250	0	248,05 ± 0,41	1,95 ± 0,41	0,78 ± 0,16	1,47 ± 0,31
	Referência	250	125	42,72 ± 2,32	207,28 ± 2,32	82,91 ± 0,93	100 ± 0,56
	FM A	250	125	57,91 ± 7,55	192,09 ± 7,55	76,84 ± 3,02	92,67 ± 3,64
	FM B	250	125	55,03 ± 0,00	194,97 ± 0,00	77,99 ± 0,00	94,06 ± 0,00
	FM C	250	125	60,37 ± 13,35	189,63 ± 13,35	75,85 ± 5,34	91,49 ± 6,44
Ensaio 2	Referência	250	125	35,29 ± 4,08	214,71 ± 4,08	85,89 ± 1,63	100,00 ± 0,95
	FM A	250	125	28,65 ± 12,66	221,35 ± 12,66	88,54 ± 5,06	103,09 ± 5,89
		250	125	46,83 ± 24,5	211,54 ± 24,5	81,27 ± 9,80	94,62 ± 11,41
		250	125	36,44 ± 4,90	203,17 ± 4,90	85,42 ± 1,96	99,46 ± 2,28
	FM B	250	125	28,07 ± 2,86	221,93 ± 2,86	88,77 ± 1,14	103,36 ± 1,33
	FM C	250	125	38,46 ± 1,22	211,93 ± 1,22	84,62 ± 0,49	98,52 ± 0,57
		250	125	40,77 ± 3,67	209,23 ± 3,67	83,69 ± 1,47	97,45 ± 1,17
		250	125	24,89 ± 16,33	225,11 ± 16,33	90,04 ± 6,53	104,84 ± 7,61

^aPara cada *pool* de frações e para o referênciado foram realizadas duas reações BVZ-VEGF₁₆₅. O VEGF₁₆₅ residual de cada reação foi dosado em duplicata. Os resultados estão expressos em termos da média dos resultados de cada reação ± DP.

3. DISCUSSÃO

Submetendo-se o BVZ (Avastin[®]) a condição de temperatura elevada, foi obtida uma amostra com significativa quantidade de instabilidades, em especial agregados e partículas proteicas, detectados com sucesso pelas técnicas analíticas selecionadas.

Os métodos de análise foram cuidadosamente definidos de forma a evitar resultados falsos, indicando ou mascarando instabilidades na formulação. Para isso, buscou-se definir diluentes e diluições da amostra que não afetassem a sensibilidade e a precisão dos resultados.

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado e os dados obtidos, definimos e aperfeiçoamos métodos analíticos complementares para avaliação da estabilidade de BVZ elegendo-se cromatografia por exclusão de tamanho (CLAE-ET), eletroforese (SDS-PAGE), análise turbidimétrica (UV-Vis), espalhamento da luz dinâmico (DLS), rastreamento de partículas (NTA) e ensaio imunoenzimático (ELISA) para a avaliação da qualidade do Avastin[®] fracionado em farmácias de manipulação.

Uma vez que não foi detectada diferença entre os espectros de massa do controle e da amostra submetida a condições drásticas de temperatura a espectrometria de massa por MALDI-TOF foi desconsiderada para a avaliação das frações de BVZ.

Associando metodologias analíticas complementares, investigamos a qualidade e a estabilidade do Avastin[®] fracionado por três farmácias de manipulação brasileiras comparando as frações com o medicamento mantido no seu frasco-ampola original.

Os resultados obtidos na determinação do volume sugerem que as frações contêm volumes estatisticamente diferentes do requisitado, verificando-se volume significativamente superior nas amostras analisadas da farmácia A. As frações das demais farmácias variaram em torno do volume requisitado apresentando, no entanto, entre 5 e 7 frações, das 24 analisadas, com volume inferior a 95% do rotulado e, portanto, fora dos limites estabelecidos pela farmacopeia brasileira (ANVISA, 2010).

A diferença em termos de conteúdo nas frações da farmácia A em relação às farmácias B e C, pode decorrer de divergências na interpretação da requisição do oftalmologista. Por considerar um medicamento injetável, a farmácia A aparentemente segue a recomendação farmacopeica de manter um excesso de volume nas frações a fim de suprir as perdas que ocorrem na aspiração do conteúdo com seringa. Os volumes obtidos para as frações das outras farmácias sugerem que essas realizam o fracionamento sem manter um excesso de medicamento nas frações ou considerar as perdas relacionadas ao fracionamento, o que acarretou em alíquotas com volumes médios inferiores, mas próximos do rotulado.

A eletroforese foi empregada por fornecer informações sobre a composição da amostra de forma rápida e abrangente. Uma vez que a mobilidade eletroforética depende do tamanho hidrodinâmico, é possível separar e identificar proteínas nas formas monoméricas e agregadas e identificar a ocorrência da agregação. Nas amostras analisadas neste estudo, assim como o registrado em estudos anteriores, não houve diferença detectável entre os perfis eletroforéticos do Avastin[®] fracionado e referência (KAHOOK *et al.*, 2011; PALMER *et al.*, 2013). Apesar de amplamente empregada, a baixa concentração de proteínas utilizada na análise e a alta concentração do anticorpo na forma monomérica tornam a eletroforese ineficiente para detectar degradações em níveis de traço, sendo requeridas análises complementares para avaliação da estabilidade das amostras.

O método cromatográfico validado nos permitiu avaliar a composição das amostras com especial atenção para a quantificação dos monômeros em solução. Conforme os dados preliminares deste estudo, CLAE por exclusão de tamanho permite a detecção de agregados de pequenos tamanhos (dímeros, trímeros e oligômeros). A formação de agregados de maior tamanho ou degradações decorrentes de fragmentação são indiretamente detectadas por redução da concentração de monômeros em solução. Comparando-se a composição do Avastin[®] referência e fracionado foi possível estimar possíveis perdas da forma monomérica por degradação. Dessa forma, empregando CLAE por exclusão de tamanho, não identificamos alterações na composição do Avastin[®] fracionado em relação ao medicamento referência.

Manutenção na concentração dos monômeros do anticorpo na formulação fracionada também foi identificada em estudos prévios empregando cromatografia de exclusão de tamanho para a avaliação da qualidade do Avastin[®] fracionado (PALMER *et al.*, 2013; PAUL *et al.*, 2012). O mesmo não foi encontrado por Liu *et al.* (2011) que identificou perda na concentração de monômeros de BVZ no Avastin[®] fracionado em seringas por farmácias de manipulação. O resultado desfavorável encontrado pelos autores pode decorrer da baixa quantidade de seringas analisadas (1 ou 3 seringas por farmácia) reduzindo a confiabilidade do resultado. Empregando ensaio imunoenzimático para quantificação de anticorpos, Kahook e *et al.* (2011) identificaram significativa diferença na concentração de BVZ entre seringas contendo o medicamento fracionado, registrando redução no conteúdo de anticorpos em duas das três farmácias investigadas.

Sabendo que o fenômeno de adsorção à superfície pode reduzir significativamente a concentração de anticorpos na formulação, podemos deduzir que a manutenção na concentração de anticorpos observado nas frações avaliadas neste estudo pode ser favorecida pelo material utilizado para acondicionamento do produto fracionado, sugerindo-se que o fracionamento em frascos e ampolas de vidro seja mais adequado do que o fracionamento em seringas praticado nos demais países (WANG *et al.*, 2005).

Devido à praticidade de administração e manipulação, seringas pré-carregadas se tornaram o principal material de acondicionamento de produtos biofarmacêuticos (JENKE, 2008). Os estudos sobre a qualidade e estabilidade do Avastin[®] fracionado publicados até o momento destacam as possíveis interações que podem ocorrer entre o material plástico da seringa e as proteínas da formulação, bem como a possível contaminação da solução injetável com partículas da seringa. Destacam-se na literatura as identificações de contaminação do produto fracionado com óleo de silicone, usado para lubrificação do êmbolo da seringa, o qual pode desencadear agregação proteica na formulação (JENKE *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2011; PALMER *et al.* 2013; PAUL *et al.*, 2012).

Por DLS, NTA e análise turbidimétrica não identificamos nenhuma agregação visível ou contaminação por particulados nas frações analisadas e obtivemos resultados equivalente entre as amostras de Avastin[®] fracionado e referência.

Por ELISA, demonstramos eficácias equivalentes do BVZ em se ligar ao seu ligante biológico nas amostras de Avastin[®] fracionado e referência. A atividade do BVZ após fracionamento do medicamento foi previamente estudada por apenas dois autores. Bakiri *et. al.* (2006) identificaram manutenção da atividade do anticorpo armazenado em seringas por até um mês, registrando queda de aproximadamente 8% após 3 meses de armazenamento das seringas a 4°C. Chen *et al.* (2009) registraram manutenção de 95% da eficácia de ligação do BVZ ao VEGF após armazenamento do medicamento em seringas por 1 mês e de 90% após 6 meses de armazenamento.

Apesar da importância do ensaio da atividade do anticorpo na investigação da qualidade e estabilidade do Avastin[®] fracionado esse teste não foi incluído nos estudos realizados por Kahook *et al.* (2011), Liu *et al.* (2011), Paul *et. al.* (2012) e Palmer *et. al* (2013) destacando a necessidade de estudos adicionais e complementares para a avaliação da prática de fracionamento.

Os dados favoráveis encontrados neste estudo podem decorrer também da alta estabilidade de anticorpos monoclonais demonstrada em estudos prévios. Paul *et al.* (2012) atribuem a alta estabilidade do BVZ à grande quantidade de ligações dissulfeto, interações entre os domínios proteicos e estrutura composta por folhas beta. Esses fatores fornecem maior estabilidade aos anticorpos monoclonais frente a aumentos da temperatura em condições não enzimáticas quando comparados a outras proteínas.

Cabe ressaltar ainda que formulações contendo proteínas de uso terapêutico são desenvolvidas e otimizadas tendo em vista as diversas perturbações à qual será submetida durante o processo de produção industrial. Isso sugere que as formulações proteicas disponíveis comercialmente tendem a apresentar robustez e estabilidade, requeridas para processo de produção, as quais contribuem para a manutenção da estabilidade do medicamento nas situações práticas de uso.

Portanto, sugere-se que, desde que tomadas as devidas precauções, o fracionamento do Avastin[®] em doses unitárias não induz alterações na atividade do biofármaco ou alterações estruturais significativas como fragmentação e agregação.

4. CONCLUSÃO

Por meio das metodologias adotadas, nenhuma instabilidade física ou química foi encontrada e a atividade biológica do BVZ foi mantida nas frações de Avastin[®] obtidas de três farmácias especializadas em manipulação de produtos estéreis, oftalmológicos ou de medicamentos especiais.

Entretanto, uma significativa variação no conteúdo das frações foi encontrada, verificando-se um volume significativamente superior ao requisitado para a farmácia A. As demais variam em torno do volume requisitado apresentando, no entanto, alíquotas com volume inferior ao requisitado e fora dos limites farmacopeicos.

Não houve diferença detectável entre as composições eletroforéticas do Avastin[®] fracionado e referência, indicando manutenção da estrutura da proteína e ausência de contaminantes proteicos, fragmentos do anticorpo ou agregados proteicos.

A CLAE por exclusão de tamanho não indicou fragmentação ou formação de agregados subvisíveis nas frações analisadas. Nenhum pico adicional foi encontrado nos cromatogramas do Avastin[®] fracionado, a quantidade nativa de dímeros na formulação não foi aumentada e o tempo de retenção e a área sob a curva dos picos referentes aos monômeros e dímeros dos anticorpos mantiveram-se inalterados. Ainda por CLAE, observou-se manutenção na concentração de anticorpos na forma monomérica nas frações de BVZ. Diferença significativa, porém abaixo de 10%, foi detectada em 3 das 15 frações analisadas da farmácia C.

Nenhuma agregação visível ou contaminação por particulados foi detectada por análise turbidimétrica. Além disso, instabilidades que alterem a distribuição de tamanho de partículas nas formulações também não foram detectadas por NTA ou DLS. Adicionalmente, os vídeos obtidos durante o rastreamento de nanopartículas não registram partículas de tamanho superior às encontradas no BVZ adotado como referência.

O ensaio biológico empregado como teste final de estabilidade demonstrou manutenção da eficácia do BVZ em se ligar ao seu ligante biológico, não sendo registrada diferença estatística entre as quantidades de VEGF consumidas no ensaio funcional.

Assim, a partir dos resultados das análises realizadas, pode-se sugerir que as amostras de Avastin[®] fracionado em doses unitárias de menor volume pelas farmácias de manipulação não sofreram alterações significativas mantendo suas propriedades físico-químicas e a estabilidade da formulação após o fracionamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, A.J. & HUGHES, D.E., Monitoring of IgG antibody thermal stability by micellar electrokinetic capillary chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical chemistry*, v. 67, n. 20, p. 3626–32, 1995.
- AMBATI, J. & FOWLER, B.J., Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron*, v.75, n.1, p. 26–39, 2012.
- ARAKAWA, T. et al. The critical role of mobile phase composition in size exclusion chromatography of protein pharmaceuticals. *Journal of pharmaceutical sciences*, v.99, n.4, p.1674–1692. 2010.
- AYOUB, T. & PATEL, N., Age-related macular degeneration. *Journal of the Royal Society of Medicine*, v. 102, n. 2, p. 56–61, 2009.
- BARNES, C.A.S. & LIM A. Applications of mass spectrometry for the structural characterization of recombinant protein pharmaceuticals. *Mass Spectrometry Reviews*, v. 26, p. 370-388, 2007.
- BAKIRI, S.J. et al. Six-month stability of bevacizumab (Avastin) binding to vascular endothelial growth factor after withdrawal into a syringe and refrigeration or freezing. *Retina*, v.26, n.5, p.519–22, 2006.
- BARDIN, C. ET AL. Guidelines for the practical stability studies of anticancer drugs: a European consensus conference. *European Journal of Hospital Pharmacy: Science and Practice*, v. 19, n.3, p.278–285, 2012.
- BRASIL, Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). Inibidores da angiogênese para o tratamento da degeneração macular relacionada à idade. *Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde*, Ano III no 6, p.1–13, 2008.
- BRASIL, Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). Farmacopeia Brasileira 5a ed., v. 1, 2010.
- BRASIL, Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). Informações sobre o uso intraocular do bevacizumabe para o tratamento de doenças oculares neovasculares, 2011.
- BRASIL, Ministério da saúde. Uso off label: erro ou necessidade? *Rev Saúde Pública*, v.46, n.2, p.398–399, 2012
- BRASIL, Ministério da Saúde. consulta pública nº 10, de 12 de setembro de 2012 *Diário Oficial da União (DOU)*, 19/09/2012, Seção 1, página 143, 2012b.
- BRASIL, Ministério da saúde. Portaria nº 48, de 23 de novembro de 2012, 2012c.
- BRASIL, Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução nº 4.381, 2012c.

CAPELLE, M.A.H., GURNY, R. & ARVINTE, T., High throughput screening of protein formulation stability: Practical considerations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.65, p.131-148, 2007.

CHEN, Y. et al., Evaluation of the Sterility, Stability, and Efficacy of Bevacizumab Stored in Multiple-Dose Vials for 6 Months growth factor. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics*, v.25, n.1, 2009.

CROMWELL, M.E.M., HILARIO, E. & JACOBSON, F. Protein aggregation and bioprocessing. *The AAPS journal*, v.8, n.3, p.572–579, 2006.

CROWTHER, J., *The ELISA guidebook* Second. Humana Press, ed., 2000.

DAMICO, F.M., Angiogênese e doenças da retina. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*, v.70, n.3, p.547–553, 2007.

ENGELSMAN, J. Den et al., Strategies for the Assessment of Protein Aggregates in Pharmaceutical Biotech Product Development. *Pharmaceutical Research*, v. 28, p.920–933, 2011.

ESTADOS UNIDOS, Food and Drug Administration (FDA).Amendment: Bevacizumab - Genentech. p.1–22, 2009.

Disponível em:

http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/125085s0169lbl.pdf.

Acessado em março de 2014.

ESTADOS UNIDOS, Food and Drug Administration (FDA).VEGF Trap-eye (aflibercept ophthalmic solution), Briefing Document.p.1–106, 2011

FERNÁNDEZ-ROBREDO P. *et al.* Current treatment limitations in age-related macular degeneration and future approaches based on cell therapy and tissue engineering. *Journal of ophthalmology*, 2014.

FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine Reviews*, v.25, n.4, p.581–611, 2004.

FILIFE, V., HAWES, A. & JISKOOT, W., Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical research*, v. 27, n.5, p.796–810, 2010.

FLATMAN, S. et al., Process analytics for purification of monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography B*, v. 848, p.79–87, 2007.

FOLKMAN, J., Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine*, 285, p.1182–1186, 1971.

FRIEDMAN, D.S. *et al.* Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Archives of ophthalmology*, v.122, p. 564–572, 2004.

GOETZ, H. et al., Comparison of selected analytical techniques for protein sizing, quantitation and molecular weight determination. *Journal of biochemical and biophysical methods*, v.60, n.3, p.281–93, 2004.

GOMES, E.C. et al. Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação do fármaco bevacizumabe por cromatografia a líquido de alta eficiência. *Química Nova*, v.35, v.3, p.608–611, 2012.

HAWE, A. et al., Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freeze – thawing and thermal stress. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 38, p.79–87, 2009.

HOSSEINI, H. et al., Anti-VEGF therapy with bevacizumab for anterior segment eye disease. *Cornea*, v.31, n.3, p.322–34, 2012

HUBSCHMAN, J.P., Reddy, S. & Schwartz, S.D., Age-related macular degeneration: current treatments. *Clinical ophthalmology*, v.3, p.155–66, 2009

JANEWAY C.A. et al. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. In: The structure of a typical antibody molecule, 5ª edição. Nova Iorque: Garland Science, 2001.

JENKE D. Suitability-for-Use considerations for prefilled syringes. *Pharmaceutical Technology*, 2008.

KAHOOK, M.Y. et al., High-molecular-weight aggregates in repackaged bevacizumab. *Retina*, v.31, n.4, p.816–7, 2011.

KAKINOKI, M. et al., Effect of vitrectomy on aqueous VEGF concentration and pharmacokinetics of bevacizumab in macaque monkeys. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(9), p.5877–80, 2012

LAHLOU, A et al., Mechanically-induced aggregation of the monoclonal antibody cetuximab. *Annales pharmaceutiques françaises*, v.67, n.5, p.340–52, 2009.

MAHLER, H.C. et al., Induction and analysis of aggregates in a liquid IgG1-antibody formulation. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, v.59, n.3, p.407–17, 2005.

MAHLER, H.C. et al., Protein Aggregation: Pathways , Induction Factors and Analysis. *Journal of pharmaceutical sciences*, v.98, n.9, p.2909–2934, 2009.

OLSEN, T.W. et al., Pharmacokinetics of pars plana intravitreal injections versus microcannula suprachoroidal injections of bevacizumab in a porcine model. *Investigative ophthalmology & visual science*, v.52, n.7, p.4749–56, 2011.

OMS. Global data on visual impairments. 2012.

PALMER, J.M., Amoaku, W.M. & Kamali, F., Quality of bevacizumab compounded for intravitreal administration. *Eye (nature)*, v.27, n.9, p.1090–1097, 2013.

PAUL, M. et al., Long-term stability of bevacizumab repackaged in 1mL polypropylene syringes for intravitreal administration. *Annales pharmaceutiques françaises*, v.70, n.3, p.139–54, 2012.

PENN, J.S. et al., Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Progress in retinal and eye research*, v.27, n.4, p.331–71, 2008.

ROCHE. Avastin® (bevacizumabe). p.31, 2013. Disponível em: http://www.dialogoroche.com.br/content/dam/dialogo/pt_br/Bulas/A/Avastin/Bula-Avastin-Profissional.pdf, acessado em março de 2013.

SATO, T. et al., Severe intraocular inflammation after intravitreal injection of bevacizumab. *Ophthalmology*, v.117, n.3, p.512-516, 2010.

SENGER, D.R. et al., Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. *Cancer metastasis reviews*, v.12, p.303–324, 1993.

SINAPIS, C.I. et al., Pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab (Avastin®) in rabbits. *Clinical ophthalmology*, v.5, p.697–704, 2011.

STAUB, A. et al., Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v.55, n.4, p.810–22, 2011.

STEINBROOK, R. The price of sight – ranibizumab, bevacizumab, and the treatment of macular degeneration. *New England Journal of Medicine*, v.355, n.14, p.1409-1412, 2006.

TERNANT, D. et al., An enzyme-linked immunosorbent assay to study bevacizumab pharmacokinetics. *Therapeutic drug monitoring*, v.32, n.5, p.647–652, 2010.

TOLENTINO, M., Systemic and ocular safety of intravitreal anti-VEGF therapies for ocular neovascular disease. *Survey of ophthalmology*, v.56, n.2, p.95–113, 2011.

WAN, J. et al. Proteins from Avastin® (bevacizumab) show tyrosine nitrations for which the consequences are completely unclear. *PLoS one*, v.7, n.4, p.1-5, 2012.

WANG, W., Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. *International journal of pharmaceutics*, v.289, p.1–30, 2005.

WANG, W.E.I. et al. Antibody structure, instability and formulation. *Journal of pharmaceutical sciences*, v.96, n.1, p.1–26, 2007.

ZHANG, Z. et al., Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies. *Mass Spectrometry Reviews*, v.228, p.147–176, 2009.

ZOLLS, S. et al. Particles in therapeutic protein formulations, Part 1. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 101, n.3, p.914–935, 2012.