

(11) Número de Publicação: **PT 1459065 E**

(51) Classificação Internacional:

G01N 33/53 (2007.10) **G01N 33/531** (2007.10)
G01N 33/537 (2007.10) **C12N 5/00** (2007.10)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2002.12.04**

(30) Prioridade(s): **2001.12.04 US 338767 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2004.09.22**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.07.28**
196/2010

(73) Titular(es):

TEVA PHARMACEUTICAL INDUSTRIES, LTD.
5 BASEL STREET, P.O. BOX 3190 49131
PETACH-TIKVA

IL

(72) Inventor(es):

ETY KLINGER

IL

(74) Mandatário:

MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA
RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **PROCESSOS PARA A MEDIÇÃO DA POTÊNCIA DO ACETATO DE GLATIRÂMERO**

(57) Resumo:

RESUMO

"PROCESSOS PARA A MEDIÇÃO DA POTÊNCIA DO ACETATO DE GLATIRÂMERO"

A presente invenção proporciona um processo para medição da potência relativa de um lote de teste de acetato de glatirâmero. Adicionalmente, a presente invenção proporciona um processo para preparação de um lote de acetato de glatirâmero aceitável para utilização farmacêutica.

DESCRIÇÃO

"PROCESSOS PARA A MEDIÇÃO DA POTÊNCIA DO ACETATO DE GLATIRÂMERO"

Ao longo deste pedido, são citadas várias referências, utilizando citações abreviadas dentro de parêntesis. As citações completas para estas referências podem ser encontradas no fim da descrição, imediatamente antes das reivindicações.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a métodos de padronização da medição da potência do acetato de glatirâmero com base no reconhecimento específico do acetato de glatirâmero por células T.

ANTECEDENTES

É desejável padronizar a medição da potência de composições farmacêuticas uma vez que existe uma potência e qualidade óptimas do componente activo que são eficazes no tratamento da doença para a qual este é administrado.

O acetato de glatirâmero (AG, também conhecido como Copolímero-1 (*Physician's Desk Reference*), Copolímero 1, Cop-1 ou COPAXONE®), é um fármaco aprovado para o tratamento de esclerose múltipla (EM). O acetato de glatirâmero consiste nos sais de acetato de polipéptidos sintéticos, contendo quatro aminoácidos de ocorrência natural (*Physician's Desk Reference*): ácido L-glutâmico, L-alanina, L-tirosina e L-lisina (*Physician's Desk Reference*) com uma fracção molar média de ácido L-glutâmico: 0,129-0,153; L-alanina: 0,392-0,462; L-tirosina: 0,086-0,100; L-lisina: 0,300-0,374,

respectivamente. O peso molecular médio do acetato de glatirâmero é de 4.700 - 11.000 daltons (*Physician's Desk Reference*). Quimicamente, o acetato de glatirâmero é designado polímero de ácido L-glutâmico com L-alanina, L-lisina e L-tirosina, acetato (sal) (*Physician's Desk Reference*). A sua fórmula estrutural é:

$(\text{Glu, Ala, Lys, Tyr})_x \cdot x\text{CH}_3\text{COOH} \quad (\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4 \cdot \text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot \text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_3)_x \cdot x\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ CAS - 147245-92-9

(*Physician's Desk Reference*). O acetato de glatirâmero é também escrito como: poli[L-Glu¹³⁻¹⁵, L-Ala³⁹⁻⁴⁶, L-Tyr^{8.6-10}, L-Lys³⁰⁻³⁷].nCH₃COOH.

Mostrou-se que o acetato de glatirâmero suprime encefalomielite auto-imune experimental (EAE) - um modelo experimental para esclerose múltipla (EM) em várias espécies animais (Lando et al., 1979; Aharoni, 1993). Estudos de EAE em murídeo sugeriram que a protecção contra EAE é mediada por actividade de células T (Aharoni, 1993). Esta protecção da indução activa de EAE através de homogenato de medula espinal de ratinho, em que estão envolvidos vários auto-antigénios, pode ser adoptivamente transferida para receptores normais através de injeção de células T supressoras específicas do acetato de glatirâmero (Aharoni, 1993). Em ensaios clínicos de fase III, verificou-se que injeções subcutâneas diárias de acetato de glatirâmero retardam a progressão da incapacidade e reduzem a taxa de relapso em esclerose múltipla em exacerbação remitente (Johnson, 1987). Os processos de fabrico de acetato de glatirâmero são descritos nas Patentes U.S. N^{os}. 3 849 550 e 5 800 808 e na Publicação Internacional PCT N^o. WO 00/05250.

É vulgarmente aceite que um elevado nível de especificidade do antígeno é uma característica da activação de células T. As células T do sistema imunitário reconhecem péptidos imunogénicos complexados com as moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II ou I, expressas em células de apresentação do antígeno (APCs). A especificidade do reconhecimento do antígeno por células T é definida por vários parâmetros: 1) afinidade do receptor de células T para o complexo de péptidos MHC; 2) sequência primária do péptido antigénico; e 3) efeitos sinérgísticos de certas combinações de aminoácidos dentro do péptido antigénico. Com base no conhecimento actual sobre o mecanismo de acção do acetato de glatirâmero, crê-se que a actividade biológica do acetato de glatirâmero em EM é mediada pela imunomodulação da actividade de células T.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção proporciona um processo para medição da potência de um lote de teste de acetato de glatirâmero relativamente à potência conhecida de um lote de referência de acetato de glatirâmero que compreende:

- a. imunização de ratinhos fêmeas (SJL x BALB/C)F1 entre as 8 e as 12 semanas de idade com uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de referência;
- b. preparação de uma cultura primária de células de nódulos linfáticos dos ratinhos do passo (a) 9-11 dias após a imunização;
- c. incubação separadamente de pelo menos cinco amostras de referência, cada uma das quais contém um número predeterminado de células da cultura primária do passo (b) e uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero entre 1 µg/mL e 25 µg/mL de um lote de referência;

d. incubação de pelo menos duas amostras, cada uma das quais contém um número predeterminado de células da cultura primária do passo (b) e uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de teste;

e. determinação para cada amostra nos passos (c) e (d), da quantidade de interleucina-2 segregada pelas células em cada amostra após 18-21 horas de incubação de tal amostra;

f. correlação das quantidades de interleucina-2 segregadas pelas amostras incubadas com o lote de teste de acetato de glatirâmero com as quantidades de interleucina-2 segregadas pelas amostras incubadas com o lote de referência de acetato de glatirâmero de modo a determinar a potência do lote de teste de acetato de glatirâmero relativamente ao lote de referência de acetato de glatirâmero,

em que em cada amostra nos passos (c) e (d), o número de células predeterminado é substancialmente idêntico, e em que para cada amostra contendo uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de teste existe uma amostra de referência correspondente contendo uma quantidade predeterminada substancialmente idêntica de acetato de glatirâmero do lote de referência.

A presente invenção proporciona também um processo para medição da potência de um lote de teste de acetato de glatirâmero relativamente à potência conhecida de um lote de referência de acetato de glatirâmero que compreende:

a. imunização de um mamífero de teste com uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de referência;

b. preparação de uma cultura primária de células do mamífero de teste do passo (a) num momento predeterminado após a imunização;

c. incubação separadamente de pelo menos duas amostras de referência, cada uma das quais contém um número predeterminado de células da cultura primária do passo (b) e uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero de um lote de referência;

d. incubação de pelo menos duas amostras, cada uma das quais contém um número predeterminado de células da cultura primária do passo (b) e uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de teste;

e. determinação para cada amostra nos passos (c) e (d), da quantidade de uma citocina segregada pelas células em cada amostra após um período de tempo predeterminado de incubação de tal amostra;

f. correlação das quantidades da citocina segregada pelas amostras incubadas com o lote de teste de acetato de glatirâmero com as quantidades da citocina segregada pelas amostras incubadas com o lote de referência de acetato de glatirâmero de modo a determinar a potência do lote de teste de acetato de glatirâmero relativamente ao lote de referência de acetato de glatirâmero,

em que em cada amostra nos passos (c) e (d), o número de células predeterminado é substancialmente idêntico, e em que para cada amostra de imunização contendo uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de teste existe uma amostra de referência correspondente contendo uma quantidade substancialmente idêntica predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de referência.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1: Imunização com AG PR (Padrão de Referência). Cultura primária de células de NL. Detecção de IL-2 através de ELISA.

Figura 2: Indução de células T específicas de AG. Culturas primárias de células de NL derivadas de ratinhos imunizados com 250 µg de AG PR + CFA ou apenas com CFA foram cultivadas na presença de concentrações crescentes de AG PR. Após incubação de um dia para o outro a 37°C os meios de cultura foram colhidos e ensaiados quanto a IL-2 através de ELISA.

Figura 3: Diagrama de hemacitômetro.

Figura 4: Optimização do protocolo de imunização - fonte da cultura e efeito da dose do AG Padrão de Referência (PR). Culturas primárias de células de Nódulos Linfáticos (NL) e do baço foram derivadas de ratinhos imunizados com 10 ou 250 µg de AG RS + adjuvante completo de Freund (CFA). As células foram cultivadas na presença de concentrações crescentes de AG PR. Após incubação de um dia para o outro a 37°C, os meios de cultura foram colhidos e ensaiados quanto a IL-2 através de ensaio imunossorvente enzimático (ELISA).

Figura 5: Optimização do protocolo de imunização - adjuvante e efeito da dose. Culturas primárias de células de NL derivadas de ratinhos imunizados com 250 µg de AG PR + CFA ou com 10 mg de AG PR + adjuvante completo de Freund (ICFA) foram cultivadas na presença de concentrações crescentes de AG PR. Após incubação de um dia para o outro a 37°C, os meios de cultura foram colhidos e ensaiados quanto a interleucina-2 (IL-2) através de ELISA.

Figura 6: Efeito do período de imunização. Ratinhos foram imunizados com 250 µg de AG PR em CFA e os LN foram removidos após 9, 10 e 11 dias. A resposta das células de NL dos diferentes grupos a várias concentrações de AG PR

foi testada *in vitro* através da medição da secreção de IL-2 por ELISA.

Figura 7: Efeito do meio de cultura na resposta de células T específicas de AG. Culturas primárias de células de NL foram cultivadas com diferentes meios contendo soro de ratinho normal (NMS) a 1%, soro fetal bovino (FBS) a 1% ou meio de cultura celular definido (DCCM1). As células foram incubadas com concentrações crescentes de AG PR durante 21 horas a 37°C. Subsequentemente, os meios de cultura foram colhidos e ensaiados quanto a IL-2 através de ELISA.

Figura 8: Cinética da secreção de IL-2 em resposta a AG PR. Uma cultura primária de células de NL foi preparada a partir de ratinhos imunizados com 250 µg de AG PR + CFA. As células foram incubadas com 0, 0,5, 2,5 e 5 µg/mL de AG PR a 37°C durante os intervalos indicados. A cada dado momento, uma alíquota de 5×10^6 células foi centrifugada e o sobrenadante foi mantido a -20°C. Todas as amostras foram ensaiadas simultaneamente quanto a IL-2 através de ELISA.

Figura 9: Estabilidade de IL-2 em meio de cultura. Uma cultura primária de células de NL foi preparada a partir de ratinhos imunizados com 250 µg de AG PR + CFA. As células foram incubadas com várias concentrações de AG PR a 37°. Após incubação de um dia para o outro, os sobrenadantes foram colhidos e divididos em duas alíquotas. Uma alíquota foi ensaiada imediatamente através de ELISA, e a segunda foi mantida durante 7 dias a -20°C antes de ser ensaiada.

Figura 10: Estabilidade da solução de AG PR a -20°C. Foi preparada uma solução de AG PR a 1 mg/mL, dividida em alíquotas e mantida a -20°C. A resposta à dose das células

específicas de AG à solução de AG PR foi testada no tempo zero (Data 1) e após 5 meses a -20°C .

Figura 11: Efeito do peso molecular médio (PM) na resposta de células T específicas de AG PR. Uma cultura primária de células de NL foi preparada a partir de ratinhos imunizados com 250 μg de AG PR + CFA. As células foram cultivadas na presença de 2 concentrações diferentes de AG PR e de AG Substância Fármaco (SF) de diferentes pesos moleculares. Após incubação de um dia para o outro a 37°C os meios de cultura foram colhidos e ensaiados quanto a IL-2 através de ELISA.

Figura 12(A e B): Reactividade cruzada de células T específicas de AG PR com AG SF e Produto Fármaco (PF). Uma cultura primária de células de NL foi preparada a partir de ratinhos imunizados com 250 μg de AG PR + CFA. A resposta das células T específicas de AG PR a outro lote de AG SF (Fig. 12A), a um lote de AG PF e a manitol (Fig. 12B) foi comparada com a resposta ao lote de AG PR. Os níveis de IL-2 no meio de cultura foram medidos através de ELISA.

Figura 13: Cinética da proteólise de AG PR por tripsina. AG PR foi proteolísado por tripsina nos momentos indicados. A actividade das amostras proteolisadas foi testada através de um teste de potência *in vitro*.

Figura 14: Cromatografia Líquida de Alta Pressão de Fase Inversa (RP-HPLC) de AG antes e após proteólise por tripsina. AG PR foi proteolísado por tripsina e o perfil cromatográfico das amostras foi testado através de RP-HPLC.

Figura 15: Cinética da proteólise de AG PR por quimiotripsina. AG PR foi proteolísado por quimiotripsina

nos momentos indicados. A actividade das amostras proteolisadas foi testada através do teste de potência *in vitro*.

Figura 16: RP-HPLC de AG antes e após proteólise por quimiotripsina. AG PR foi proteolizado por quimiotripsina e o perfil cromatográfico das amostras foi testado através de RP-HPLC.

DESCRIÇÃO DETALHADA

A presente invenção proporciona um processo para medição da potência de um lote de teste de acetato de glatirâmero relativamente à potência conhecida de um lote de referência de acetato de glatirâmero que compreende:

- a. imunização de ratinhos fêmeas (SJL x BALB/C)F1 entre 8 e 12 semanas de idade com uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de referência.
- b. preparação de uma cultura primária de células de nódulos linfáticos dos ratinhos do passo (a) 9-11 dias após a imunização;
- c. incubação separadamente de pelo menos cinco amostras de referência, cada uma das quais contém um número predeterminado de células da cultura primária do passo (b) e uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero entre 1 µg/mL e 25 µg/mL de um lote de referência;
- d. incubação de pelo menos duas amostras, cada uma das quais contém um número predeterminado de células da cultura primária do passo (b) e uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de teste;
- e. determinação para cada amostra nos passos (c) e (d), da quantidade de interleucina-2 segregada pelas

células em cada amostra após 18-21 horas de incubação de tal amostra;

f. correlação das quantidades de interleucina-2 segregadas pelas amostras incubadas com o lote de teste de acetato de glatirâmero com as quantidades de interleucina-2 segregadas pelas amostras incubadas com o lote de referência de acetato de glatirâmero de modo a determinar a potência do lote de teste de acetato de glatirâmero relativamente ao lote de referência de acetato de glatirâmero,

em que em cada amostra nos passos (c) e (d), o número de células predeterminado é substancialmente idêntico, e em que para cada amostra contendo uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de teste existe uma amostra de referência correspondente contendo uma quantidade substancialmente idêntica predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de referência.

Numa forma de realização, seis amostras de referência são incubadas separadamente no passo (d).

A presente invenção proporciona também um processo para medição da potência de um lote de teste de acetato de glatirâmero relativamente à potência conhecida de um lote de referência de acetato de glatirâmero que compreende:

- a. imunização de um mamífero de teste com uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de referência;
- b. preparação de uma cultura primária de células do mamífero de teste do passo (a) num momento predeterminado após a imunização;
- c. incubação separadamente de pelo menos duas amostras de referência, cada uma das quais contém um número predeterminado de células da cultura primária do passo

(b) e uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero de um lote de referência;

d. incubação de pelo menos duas amostras, cada uma das quais contém um número predeterminado de células da cultura primária do passo (b) e uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de teste;

e. determinação para cada amostra nos passos (c) e (d), da quantidade de uma citocina segregada pelas células em cada amostra após um período de tempo predeterminado de incubação de tal amostra;

f. correlação das quantidades da citocina segregada pelas amostras incubadas com o lote de teste de acetato de glatirâmero com as quantidades da citocina segregada pelas amostras incubadas com o lote de referência de acetato de glatirâmero de modo a determinar a potência do lote de teste de acetato de glatirâmero relativamente ao lote de referência de acetato de glatirâmero,

em que em cada amostra nos passos (c) e (d), o número de células predeterminado é substancialmente idêntico, e em que para cada amostra de imunização contendo uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de teste existe uma amostra de referência correspondente contendo uma quantidade predeterminada substancialmente idêntica de acetato de glatirâmero do lote de referência.

Numa forma de realização, a citocina é uma interleucina.

Numa forma de realização preferida, a interleucina é interleucina-2.

Noutra forma de realização, a interleucina é interleucina-6.

Ainda noutra forma de realização, a interleucina é interleucina-10.

Numa forma de realização adicional, a citocina é interferão-gama.

Numa forma de realização, o mamífero produz células T específicas para acetato de glatirâmero padrão de referência.

Noutra forma de realização, o mamífero é um roedor.

Ainda noutra forma de realização, o roedor é um ratinho.

Numa forma de realização adicional, o ratinho é um ratinho fêmea (SJL x BALB/C)F1.

Noutra forma de realização, o mamífero tem cerca de 8 a cerca de 12 semanas de idade.

Ainda noutra forma de realização, as células são células de nódulos linfáticos.

Numa forma de realização, as células são células do baço.

A presente invenção proporciona ainda um processo para preparação de um lote de acetato de glatirâmero aceitável para utilização farmacêutica que compreende:

- a. preparação de um lote de acetato de glatirâmero;
- b. medição da potência relativa do lote de acordo com o processo da reivindicação 1; e
- c. qualificação do lote como aceitável para utilização farmacêutica se a potência relativa medida estiver entre 80% e 125% do lote de referência de acetato de glatirâmero.

Adicionalmente, a presente invenção proporciona um processo para preparação de acetato de glatirâmero aceitável para utilização farmacêutica que compreende:

- a. preparação de um lote de acetato de glatirâmero;
- b. medição da potência relativa do lote de acordo com o processo da reivindicação 3; e
- c. qualificação do lote como aceitável para utilização farmacêutica se a potência relativa medida estiver entre 80% e 125% do lote de referência de acetato de glatirâmero.

Assim, a presente invenção proporciona a padronização da medição da potência de AG. O teste de potência determina quantitativamente a actividade biológica de AG. Esta é a primeira apresentação de sempre de um tal teste. Este

método de padronização é essencial para mostrar reprodutibilidade de lote para lote em relação à potência e qualidade de SF e PF. No contexto deste pedido, SF refere-se ao ingrediente activo, i.e., AG. FP é utilizado para indicar o produto acabado, i.e., Copaxone®. PR denota um lote de acetato de glatirâmero possuindo um peso molecular médio de cerca de 7000 Da.

A presente invenção utiliza a observação de que as células T incubadas com uma citocina, p.ex., IL-2, proliferam em resposta a essa citocina (Lisak et al., 1974).

Os exemplos que se seguem descrevem a invenção em detalhe em relação a mostrar como podem ser feitas certas formas de realização específicas representativas desta, sendo os materiais, aparelhos e passos do processo entendidos como exemplos que se pretende sejam apenas ilustrativos. Em particular, a invenção não deve ser entendida como estando limitada aos métodos, materiais, condições, parâmetros do processo, aparelhos e semelhantes especificamente aqui citados.

EXEMPLOS EXPERIMENTAIS

DELINEAÇÃO GERAL DO PROCEDIMENTO

Os ratinhos foram imunizados com 250 µg de AG PR em CFA. AG PR foi produzido tal como descrito na Patente U.S. N°. 5,800,808 ou no Pedido Internacional PCT N°. WO 00/05250. O AG PR foi escolhido com base nas propriedades químicas e biológicas no intervalo médio de Copaxone® tal como descrito acima. Após 9-11 dias, foi preparada uma cultura primária de células de NL, e as células foram incubadas com várias concentrações de AG PR e com amostras de teste. Após 18-21 horas de incubação a 37°C numa incubadora de CO₂

humidificada, os meios de cultura foram colhidos e o nível de IL-2 foi medido através de ELISA. A resposta das células T a cada lote de SF foi testada a duas concentrações (dentro do intervalo linear), e a % de potência do lote de SF foi calculada relativamente à do lote de AG PR.

EXEMPLO 1: PROCEDIMENTO PADRÃO

Objectivo

O objectivo deste procedimento foi determinar a potência relativa do lote de AG SF *in vitro*, utilizando células T específicas de AG PR.

Equipamento

Câmara de fluxo laminar, hemacitómetro, lamelas descartáveis, centrífuga de contagem de células, incubadora com agitação de temperatura controlada, incubadora de CO₂ a 5% de temperatura controlada e humidificada, microscópios ópticos e invertidos, leitor de ELISA (filtro de 450 nm), congelador, tesouras refrigeradoras, fórceps, processador por passos (*stepper*), pipetas 40-200 µL, pipetas 200-1000 µL, pipetas 5-40 µL, controlador de pipetas, seringas de vidro estéreis e pontes de luer.

Consumíveis

Criotubos, placa de ELISA de 96 poços de ligação aumentada (Nunc, Cat. # 442404), placa de microteste de 96 poços não estéril (Falcon, Cat. # 3911), placa de cultura de tecidos de 24 poços de fundo raso esterilizada (Nunc, Cat. # 143982), caixas de petri, tubos Eppendorf (polipropileno), pontas de pipeta esterilizadas de 200-1000 µL, pipetas: 2, 5 e 10 mL, bata de laboratório, luvas, filtro de acetato de celulose de 0,2 µ, sistema de filtração de 200 mL (Corning, Cat. # 430767), lenços de papel Kimwipe, plataforma de

suporte, seringas de 10 mL, agulhas 21Gx1 1/2", seringas de insulina e Combitips de 5 mL.

Materiais e reagentes

Para o procedimento de imunização

Etanol a 95% (Bio Lab, Cat. # 13680605, ou equivalente), etanol a 70% preparado a partir de etanol a 95% através de diluição com água destilada, solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1× (SIGMA, Cat. # 3813, ou equivalente), CFA contendo 1 mg de *Micobacterium tuberculosis* (MT) (H37Ra, ATCC 255177), (SIGMA, Cat. # F-5881, ou equivalente), e lote de AG PR.

Para o procedimento de bioensaio *in vitro*

Etanol a 95% (Bio Lab, Cat. # 13680605, ou equivalente), etanol a 70% preparado a partir de etanol a 95% através de diluição com água destilada, azul tripano (BDH, Cat. # 3407), DCCM1 (Meio de Cultura Celular Definido) (Beit Haemek, Cat. # 05-010-1A ou equivalente), RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Beit Haemek, Cat. # 01-100-1A), L-glutamina esterilizada 2 mM × 100 (Bio Lab, Cat. # 13.015), MEM esterilizado (Meio Essencial Mínimo) - aminoácidos não essenciais × 100 (Bio Lab, Cat. # 11.080), piruvato de sódio esterilizado 1 mM × 100 (Bio Lab, Cat. # 13.016), Solução de antibiótico/antimicótico 1 (Bio Lab, Cat. # 13.020), 2-mercaptoetanol (SIGMA, Cat. # M-7154), PBS (SIGMA, Cat. # 3813), concavalina A (Con A) (SIGMA, Cat. # C-5275), péptido de MBP (Proteína Básica da Mielina) (87-99) (BACHEM, Cat. # H-1964, ou equivalente), e AG PR.

Para o ELISA

A IL-2 foi medida através do estojo de ELISA: OptEIA™ Set: IL-2 de ratinho (Pharmlingen, Cat. # 2614KI, ou equivalente).

Animais

Foram utilizados ratinhos fêmeas (SJL x BALB/C)F1 entre 8-12 semanas de idade (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME), embora possam ser utilizados ratinhos fêmeas (BALB/C)F1 entre 8-12 semanas de idade de outras fontes. As condições de alojamento e cuidados dos animais foram mantidas em condições livres de patógenos específicos (SPF).

Soluções

Tabela 1 : Procedimentos para fazer soluções

PBS esterilizado	O conteúdo de uma embalagem de PBS foi dissolvido em 1 litro de água bidestilada (ddH ₂ O). O tampão foi filtrado através de um filtro de acetato de celulose de 0,2 µ e mantido no frigorífico (2-8°C) até uma semana.
Azul tripano a 2% (p/v) em PBS	Cerca de 0,5 g de Azul tripano foram dissolvidos em 25 ml de PBS filtrado e armazenados no frigorífico até 6 meses.
Azul tripano a 0,1% (v/v) em PBS	Solução de Azul tripano a 0,1% foi preparada a partir da solução de reserva de Azul tripano a 2% e filtrada através de um filtro de acetato de celulose de 0,2 µ. A solução de Azul tripano a 0,1% foi armazenada à temperatura ambiente até um mês.
2-Mercaptoetanol esterilizado	Foram adicionados 10 µl de 2-mercaptoetanol a 9,99 ml de PBS esterilizado e filtrou-se através de uma membrana de acetato de celulose de 0,2 µ e manteve-se no frigorífico até 3 meses.
Solução de reserva de AG PR de 1 mg/mL	Cerca de 10 mg de acetato de glatirâmero PR foram rigorosamente pesados e dissolvidos em ddH ₂ O até uma concentração de aprox. 1,2 mg/mL. A densidade óptica (DO) da solução de PR foi medida a 275 nm. A DO foi ajustada a aprox. 1,03 com ddH ₂ O, e obteve-se uma solução de reserva de 1 mg/mL de AG PR. A solução foi bem misturada, dividida em alíquotas de trabalho (200-500 µL) e armazenada a -20°C até à utilização.
MEM esterilizado × 100	A solução esterilizada foi dividida em alíquotas de 5 mL cada, e mantida a -20°C até à utilização. Após descongelação, a alíquota de trabalho foi mantida no frigorífico até um mês.

Solução	de	A embalagem original de 20 mL foi mantida a 20°C. A
---------	----	---

antibiótico/antimicrobiano 1	embalagem foi aberta e todo o conteúdo foi dividido em alíquotas de 2 mL cada e armazenada a -20°C até à utilização. A alíquota de trabalho era estável e foi capaz de ser sujeita a vários ciclos de congelação-descongelação.
L-glutamina 2 mM x100 esterilizada	O conteúdo da embalagem aberta foi dividido em alíquotas de 2 mL cada e mantido a -20°C até à utilização.
Meio DCCM1 enriquecido	Para 100 mL de DCCM1 estéril enriquecido, foram misturados os seguintes componentes: 1 mL de L-glutamina (2 mM), 1 mL de MEM, 1 mL de piruvato de sódio (1 mM), 200 µL de solução de antibiótico/antimicrobiano 1, 400 µL de 2-mercaptoetanol e 96,4 mL de DCCM1. O DCCM1 enriquecido foi filtrado através de um filtro de acetato de celulose de 0,2 µ e armazenado no frigorífico até 1 semana.
Péptido de MBP	<u>Banco primário:</u> A solução de reserva de 10 mg/mL em ddH ₂ O foi preparada, dividida em alíquotas de trabalho e mantida a 20°C. <u>Banco secundário:</u> Uma alíquota do banco primário (10 mg/mL) foi descongelada e diluída até 1 mg/mL com ddH ₂ O. A solução do banco primário foi dividida em alíquotas de trabalho de 50 µL cada e mantida a -20°C. Após utilização, uma alíquota do banco secundário foi descongelada e diluída com DCCM1 enriquecido para obter uma solução de 20 µg/mL.
Solução de Con A	<u>Banco primário:</u> O conteúdo de um frasco de 5 mg de Con foi dissolvido em 1 mL de PBS, bem misturado e dividido em alíquotas de 50 µL cada. As alíquotas foram mantidas a -20°C até expirar a data estabelecida pelo fabricante. <u>Banco secundário:</u> Uma alíquota do banco primário (5 mg/mL) foi descongelada e diluída com 4,95 mL de meio DCCM1 enriquecido para se obter uma solução de 50 µg/mL. A solução foi dividida em alíquotas de trabalho de 100 µL cada e mantida a -20°C. Após utilização, uma alíquota do banco secundário foi descongelada e diluída até 1 mL (uma diluição de 10 vezes) com DCCM1 enriquecido para obter uma solução de 5 µg/mL de Con A.

Imunização

A emulsão de AG PR em CFA foi preparada sob condições estéreis, i.e., numa câmara de fluxo laminar, utilizando equipamento e materiais estéreis.

Preparação da solução de AG PR

Cerca de 15 mg de AG PR foram pesados com exactidão e dissolvidos em PBS estéril até uma concentração de 5 mg/mL.

Preparação da emulsão de AG PR

Foram misturados volumes iguais de solução de AG PR (5 mg/mL) e CFA. A mistura foi transferida para uma seringa de vidro estéril ligada a uma segunda seringa de vidro através de uma ponte de luer. A mistura foi bem misturada ao ser transferida de uma seringa para outra até a mistura estar bem emulsionada. Uma emulsão estável foi confirmada quando uma gota da emulsão flutuou em água sem se dispersar.

Injecção

A emulsão de AG PR foi transferida para uma seringa de insulina. Depois, foram injectados 100 μ L da emulsão (250 μ g de AG por ratinho) nas quatro almofadas da pata de cada ratinho ingénuo (cerca de 25 μ L em cada almofada da pata). Os ratinhos imunizados foram utilizados para o teste *in vitro* 9-11 dias após a imunização.

Preparação de uma cultura primária de células de NL

A cultura primária de células de NL foi preparada 9-11 dias após a imunização, de acordo com o seguinte procedimento:

Procedimento cirúrgico para remoção de células de NL

A lâmpada de UV foi ligada 20 minutos antes de começar o trabalho na câmara de fluxo laminar e desligada quando o trabalho começou. Antes de colocar quaisquer reagentes sob o fluxo, a superfície de trabalho foi limpa com uma solução de etanol a 70%. Foi preparado meio DCCM1 enriquecido. O DCCM1 enriquecido e o meio RPMI foram pré-aquecidos a 37°C antes da utilização. Os ratinhos foram sacrificados através de deslocamento cervical. Cada ratinho foi colocado de costas e preso a uma plataforma de suporte. O abdómen foi vaporizado com álcool a 70% e foi feita uma incisão média (uma incisão de 2 cm de comprimento foi habitualmente suficiente). A pele foi intersectada até às patas

posteriores e foram localizados os NL das patas posteriores e anteriores. Os NL foram transferidos para uma caixa de petri estéril contendo cerca de 5 mL de meio RPMI estéril e as células de NL foram separadas através do êmbolo de uma seringa estéril. A seringa estéril foi utilizada para recolher a suspensão de células a partir da caixa de petri (a colheita de restos de tecido foi evitada através da utilização de agulhas estéreis). A suspensão de células foi transferida para um tubo estéril de 50 mL.

Contagem de células: Exemplo de procedimento para contagem de células de NL derivadas de 5 ratinhos imunizados

O tubo das células foi enchido com meio RPMI até 40 mL. As células de NL foram centrifugadas a 200 $\times$ g durante 10 minutos à temperatura ambiente (15-25°C). O sedimento foi ressuspenso com 40 mL de RPMI. Foram tiradas duas alíquotas de 50 μ L da suspensão de células diluída 4 vezes com 150 μ L de Azul tripiano a 0,1% num poço de microteste. As alíquotas foram bem misturadas através de pipetagem suavemente para cima e para baixo. O hemacitômetro foi coberto com uma lamela. Foi utilizada uma pipeta de 50-200 μ L para carregar ambas as alíquotas nas câmaras superior e inferior do hemacitômetro, uma suspensão em cada câmara. A mistura foi deixada assentar dentro das câmaras durante cerca de 2 minutos. Foi tido cuidado para não introduzir bolhas na câmara. A mistura (suspensão celular + Azul tripiano) foi deixada cobrir toda a superfície da câmara. Se estivessem presentes bolhas na câmara, ou se esta estivesse sobrecarregada, o hemacitômetro era completamente limpo e seco com lenços de papel e as câmaras eram novamente carregadas.

As células viáveis foram contadas no quadrado central (composto de 25 quadrados grandes de 16 quadrados pequenos

cada, ver Fig. 3) das câmaras superior e inferior. As células viáveis não absorveram Azul tripano e por isso caracterizaram-se por uma aparência transparente. No entanto, as células mortas eram permeáveis ao Azul tripano e surgiram de cor azul. As células que surgiam no bordo do quadrado central eram contadas apenas se uma porção da célula estivesse de facto no quadrado central. Se uma célula estivesse no bordo, e não estivesse de todo dentro do quadrado central, não era contada. A densidade celular foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Número médio de células viáveis (ambas as câmaras)} \times 4 \times 10^4 = \frac{\text{células}}{\text{mL}}$$

As células foram centrifugadas a 200 ×g durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram ressuspensas até uma densidade de 1×10^7 células/mL com DCCM1 enriquecido.

Bioensaio *in vitro*

O bioensaio *in vitro* foi efectuado numa placa de teste de cultura de tecidos de 24 poços, de fundo raso a um volume final de 1 mL.

Preparação da curva de calibração de AG PR

Uma alíquota de 1 mg/mL de reserva de AG PR foi descongelada. A solução de reserva de AG PR foi diluída até 100 µg/mL (10 vezes) com meio DCCM1 enriquecido e filtrado através de um filtro de acetato de celulose de 0,2 µ. Foram preparadas seis diluições em série da solução de AG PR com meio DCCM1 enriquecido entre 2-50 µg/mL, tal como descrito pelo exemplo na Tabela 2.

Tabela 2: Exemplo para preparação de diluições de AG PR

CONCENTRAÇÃO DE AG PR (μ /mL)	VOLUME (μ L) DE SOLUÇÃO DE RESERVA DE AG PR (100 μ g/mL)	VOLUME (μ l) DE DCCM1 ENRIQUECIDO
50	1000	1000
30	600	1400
20	400	1600
10	200	1800
5	100	1900
2	40	1960

Preparação de diluições de AG SF

Cerca de 10–20 mg de AG SF do lote a testar foram pesados com exactidão e dissolvidos com ddH₂O até 1,2 mg/mL. A DO menos o branco da solução foi medida a 275 nm. A DO da amostra foi ajustada a aprox. 1,03 com ddH₂O para obter uma solução de reserva de 1 mg/mL de AG. Foi preparada a solução de reserva de 100 μ /mL com DCCM1 enriquecido e filtrada através de um filtro de acetato de celulose de 0,2 μ . A solução de reserva foi diluída até 10 e 20 μ g/mL tal como descrito na Tabela 2 para o lote de PR.

Reacção do ensaio

Foi adicionado o seguinte à placa de cultura de tecidos de 24 poços de fundo raso (ver um exemplo de um molde de placa abaixo):

AG PR

0,5 ml de células de NL (densidade final, por exemplo, 5×10^6 células/poço).

0,5 ml de cada diluição de AG PR, assim as concentrações finais de AG PR nos poços foram de 25, 15, 10, 5, 2,5 e 1 μ g/mL.

Amostras de AG SF

0,5 ml de células de NL (densidade final, por exemplo, 5×10^6 células/poço).

0,5 ml de cada diluição da amostra, assim as concentrações finais da amostra de teste no poço foram de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$.

Cada teste incluiu os seguintes controlos:

1) Controlo negativo - células de NL incubadas com um péptidos de controlo:

0,5 ml de células de NL (densidade final de 5×10^6 células/poço)

0,5 ml de solução de péptido de MBP (20 $\mu\text{g/mL}$) em DCCM1 enriquecido (concentração final de 10 $\mu\text{g/mL}$)

2) Controlo positivo - células de NL estimuladas com Con A (estimulante de células T não específico):

0,5 ml de células de NL (densidade final de 5×10^6 células/poço)

0,5 ml de Con A (5 $\mu\text{g/mL}$) em DCCM1 enriquecido (concentração final de 2,5 $\mu\text{g/mL}$)

Exemplo para um molde de placa

AG PR* 1 $\mu\text{g/mL}$	AG PR* 2,5 $\mu\text{g/mL}$	AG PR* 5 $\mu\text{g/mL}$	AG PR* 10 $\mu\text{g/mL}$	AG PR* 15 $\mu\text{g/mL}$	AG PR* 25 $\mu\text{g/mL}$
Amostra 1 5 $\mu\text{g/mL}$	Amostra 1 10 $\mu\text{g/mL}$				
Amostra 2 5 $\mu\text{g/mL}$	Amostra 2 10 $\mu\text{g/mL}$				
Amostra 3 5 $\mu\text{g/mL}$	Amostra 3 10 $\mu\text{g/mL}$			Controlo Negativo	Controlo Positivo
AG PR* - Acetato de glatirâmero padrão de referência.					

A densidade das células foi mudada dependendo da sua resposta a AG. As culturas foram mantidas a 37°C numa incubadora de CO₂ a 5% humidificada durante 18-21 h. A placa foi centrifugada a 200 $\times g$ durante 10 minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram colhidos para

criotubos. Os sobrenadantes foram divididos em alíquotas de trabalho para evitar congelação/descongelação repetida das amostras. Os sobrenadantes foram armazenados a -20°C até uma semana. A câmara foi limpa com solução de etanol a 70% e seca com lenços Kimwipe. As luvas foram removidas e as mãos foram imediatamente lavadas com desinfectante.

ELISA para detecção de IL-2

Todas as amostras foram testadas em triplicado. Cada placa corrida incluía o seguinte:

1) Curva padrão de IL-2 - incluindo pelo menos 6 concentrações não zero de IL-2.

2) Branco

+ 1^o anticorpo, sem padrão de IL-2 + 2^o anticorpo (ponto zero).

3) Amostras

O meio de cultura de AG PR, amostras de teste e controlos foi diluído com DCCM1 enriquecido como se segue:

a) Uma diluição de 2 vezes das amostras de 1 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de AG PR e da amostra de controlo negativo;

b) Diluições de 5-10 vezes das amostras de 5-25 $\mu\text{g/mL}$ de AG PR e das amostras de teste; e

c) Uma diluição de 15-20 vezes da amostra de controlo positivo (Con A).

O protocolo de ELISA para medição dos níveis de IL-2 foi efectuado de acordo com as recomendações do fabricante. Se a densidade óptica de qualquer amostra alcançasse os limites superior/inferior do leitor de placas, a amostra era reanalisada a uma diluição superior/inferior, respectivamente.

Cálculos e critérios de aceitação

Medições de ELISA

A absorvância média foi subtraída da amostra do branco (ponto zero do padrão de IL-2) da absorvância dos padrões, amostras e controles, e calculados para cada conjunto de triplicados, a média (absorvância-branco), o desvio padrão (DP), e o desvio padrão relativo (DPR).

Réplicas das Amostras

Sempre que se suspeitava de um valor extremo (*outlier*), era necessário assegurar que esse valor tinha base estatística, para elucidar quaisquer potenciais problemas que pudessem ter afectado os resultados globais. Se o DPR entre as medições em triplicado fosse superior a 10% e a DO média do branco fosse $> 0,300$, era aplicada a rejeição do valor extremo utilizando o teste Q de Dixon. O teste Q de Dixon foi utilizado para rejeitar possíveis valores extremos quando os critérios de aceitação relevantes não eram satisfeitos num teste baseado em replicados. O teste dos valores extremos era aplicável apenas a medições replicadas da mesma solução padrão. Para menos de 10 observações, apenas foi possível determinar e eliminar 1 valor extremo. Este procedimento expandiu a utilização do Teste Q de Dixon na rejeição de valores extremos de qualquer número de medições replicadas entre 3 e 7, com um nível de confiança de 95%.

Procedimento

O valor extremo suspeito foi designado X_1 . Todas as outras medições foram marcadas em referência ao valor extremo suspeito, p.ex., X_2 era o valor a seguir ao valor extremo suspeito, X_3 era o segundo valor em relação ao valor extremo suspeito, X_k era o mais afastado do valor extremo suspeito e X_{k-1} era o segundo valor antes do mais afastado, etc.

Para 3-7 replicados, foi utilizada a seguinte equação:

$$\frac{X_2 - X_1}{X_k - X_1}$$

O valor k apropriado foi determinado a partir da fracção calculada utilizando a Tabela 3.

Tabela 3: Valor de k

Nº. de Observações (k)	Valor a P ₉₅
3	0,94
4	0,76
5	0,642
6	0,560
7	0,507

Se não era identificado qualquer valor extremo através do Teste Q de Dixon mas a % de diferença entre 2 dos 3 replicados não era de mais de 10%, eram utilizados os 2 replicados mais próximos para o cálculo da % de potência. De outro modo, o teste de ELISA era repetido para esta amostra.

Foi aplicada rejeição de valores extremos de amostras com DO < 0,300 (branco, controlo negativo e pontos de padrão baixos). Quando era localizado um valor extremo, era rejeitado e relatado. Medições em duplicado foram utilizadas para o cálculo da % de potência.

Amostras de Branco

A absorvância de cada uma das amostras de branco foi ≤10% da média da absorvância da concentração mais elevada do padrão de IL-2. Se um dos replicados de branco estivesse

para além dos limites acima, era rejeitado e eram utilizadas as amostras em duplicado.

Curva Padrão de IL-2

A curva padrão de IL-2 foi representada num gráfico de acordo com as recomendações do fabricante. Era possível rejeitar os padrões de IL-2 que exibiam fraca sensibilidade ou erro de processamento da amostra se um mínimo de seis concentrações não zero dos padrões de IL-2 permanecessem na curva. A concentração de padrão calculada teve um erro relativo (ER) superior a 20% para o ponto de calibração mais baixo e de $\pm 15\%$ para todas as outras concentrações. A curva de calibração de IL-2 foi construída a partir de pelo menos seis pontos de concentrações não zero (pelo menos 17 pontos de calibração), cobrindo o intervalo de concentrações esperadas. O intervalo da curva padrão era passível de ser truncado se falhasse a concentração mais elevada ou mais baixa. O R^2 da curva de regressão linear foi $\geq 0,97$.

Controlos do Ensaio

A concentração de IL-2 foi calculada em todas as amostras a partir do gráfico de regressão linear do padrão de IL-2, utilizando a equação da curva de regressão linear. A concentração final de IL-2 foi calculada em todas as amostras através de multiplicação pelo factor de diluição das amostras.

Controlo Negativo (Péptido de MBP)

A concentração final de IL-2 em pelo menos 2 dos 3 replicados da amostra de controlo negativo estava abaixo dos níveis de IL-2 medidos para o ponto de calibração mais baixo da curva de AG PR.

Controlo Positivo (Con A)

A concentração final de IL-2 em pelo menos 2 dos 3 replicados da amostra de controlo positivo foi semelhante ou acima do nível de IL-2 no ponto de calibração mais elevado da curva de AG PR.

Cálculo da potência relativa de lotes de AG SF

Curva de AG PR

A curva de AG PR foi representada num gráfico numa escala log-log, com o logaritmo da concentração de IL-2 no eixo dos yy e o logaritmo da concentração de AG PR no eixo dos xx. A curva de calibração foi construída a partir de pelo menos cinco concentrações não zero (pelo menos 14 pontos de calibração). Foram rejeitados pontos de calibração tal como descrito para os pontos do padrão de IL-2. A curva de regressão de melhor ajuste foi calculada através dos pontos padrão. O R^2 foi $\geq 0,97$. O declive (β) foi $\geq 0,77$.

Análise do paralelismo

A curva de resposta à dose de cada amostra de teste foi representada em gráfico numa escala log-log, com o logaritmo da concentração de IL-2 no eixo dos yy e o logaritmo da concentração de AG SF no eixo do xx. A curva de regressão de melhor ajuste foi calculada através dos pontos da amostra. O declive (β^*) esteve dentro do seguinte intervalo:

$$\beta \times 0,635 \leq \beta^* \leq \beta \times 1,365$$

Se β^* estivesse fora dos limites, o teste *in vitro* era repetido em duplicado (duas preparações da amostra separadas). Se β^* num novo teste falhasse, o lote era rejeitado. Se β^* em ambos os novos testes estivesse dentro

dos limites, era determinada a % de potência e os limites de confiança de 95%.

Estimativa da % de potência e dos limites de confiança

A estimativa do erro aleatório a utilizar para determinar os Limites de Confiança (que têm uma probabilidade de 95% de incluir a "verdadeira % de potência") foi obtida através da utilização de ANOVA. Esta técnica estatística divide a variação total entre as respostas observadas em componentes separadas, nomeadamente:

- | | | |
|--|---|----------------|
| 1. devido a resposta à dose linear | } | Modelo |
| 2. devido ao efeito médio da preparação | | |
| 3. devido a desvio do paralelismo | } | Erro aleatório |
| 4. devido a desvio da linearidade | | |
| 5. devido a variação residual entre replicados | | |

Os componentes 3 e 4 foram incluídos no termo de erro aleatório devido a desvios não significativos da linearidade e do paralelismo, respectivamente. A soma total dos quadrados foi fraccionada em 3 componentes (SQ-Regressão, SQ-Preparação e SQ-Erro), o número apropriado de graus de liberdade e o teste F para significância.

A % de potência do lote testado e os limites de confiança a 95% para a potência estimada foram calculados tal como descrito abaixo:

Algoritmo Computacional para o Cálculo da Potência Relativa e dos Limites de Confiança a 95%

Passo 1: Cálculo da transformação dos dados oferecidos (Lote de AG e AG PR) na escala $\log_{10}$:

$$Y_{ki} = \log_{10}(\text{resposta}_{ki}); \quad i=1, \dots, n_k$$

$$X_{ki} = \log_{10}(\text{dose}_{ki}); \quad i=1, \dots, n_k$$

onde $k=1,2$ é um índice de preparação do lote de AG e AG RS, respectivamente;

n_1 e n_2 são o número total de medições efectuadas para o lote de AG e AG RS, respectivamente.

Assim, $N=n_1+n_2$ é o número total global de observações.

Passo 2: Calcular o declive comum para a regressão linear com base em todos os pontos de dados medidos através da fórmula:

$$\beta = \frac{\sum_{j=1}^N (Y_j - \bar{Y}) \cdot (X_j - \bar{X})}{\sum_{j=1}^N (X_j - \bar{X})^2};$$

onde $\bar{Y}$ é um valor médio global de $\log_{10}(\text{resposta})$;

$\bar{X}$ é um valor médio global de $\log_{10}(\text{dose})$.

Passo 3: Calcular a soma dos quadrados devido a regressão em $\log_{10}(\text{dose})$ como:

$$SQ_{REG} = \beta^2 \cdot \sum_{j=1}^N (X_j - \bar{X})^2;$$

Passo 4 : Calcular a soma dos quadrados dos erros aleatórios como:

$$SQ_{ERR} = \sum_{k=1}^2 \sum_{i=1}^{n_k} [Y_{ki} - \bar{Y}_k - \beta \cdot (X_{ki} - \bar{X}_k)]^2;$$

onde $\bar{Y}_k$, $\bar{X}_k$ são os valores médios do $\log_{10}$ (resposta) e do $\log_{10}$ (dose), respectivamente, da preparação k.

Passo 5 : Calcular o termo Erro da Média dos Quadrados como se segue:

GL_{ERR} (graus de liberdade do erro aleatório) = N-3;

$MQ_{ERR} = SQ_{ERR} / GL_{ERR}$.

Passo 6 : Utilizar as tabelas estatísticas da distribuição t para verificar o valor apropriado da estatística t:

$t = t(0,975, GL_{ERR})$.

Passo 7: Calcular a estimativa pontual da potência relativa como se segue:

$$\% \text{ Potência} = 10^{\frac{\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2}{\beta} - (\bar{X}_1 - \bar{X}_2)} \cdot 100\%;$$

Passo 8 : Calcular a expressão denominada C através da fórmula:

$$C = \frac{SQ_{REG}}{SQ_{REG} - MQ_{ERR} \cdot t^2};$$

Passo 9: Calcular os logaritmos dos limites inferior e superior do Intervalo de Confiança a 95%:

$$\text{Log}_{10}(\text{Limite Inferior}) = C \cdot \frac{\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2}{\beta} - (\bar{X}_1 - \bar{X}_2) - \frac{\sqrt{MQ_{ERR} \cdot C} \cdot t}{\beta} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{(\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2)^2}{SQ_{REG} - MQ_{ERR} \cdot t^2}}$$

$$\text{Log}_{10}(\text{Limite Superior}) = C \cdot \frac{\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2}{\beta} - (\bar{X}_1 - \bar{X}_2) + \frac{\sqrt{MQ_{ERR} \cdot C} \cdot t}{\beta} \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{(\bar{Y}_1 - \bar{Y}_2)^2}{SQ_{REG} - MQ_{ERR} \cdot t^2}}$$

Passo 10: Transformar os valores calculados no passo anterior na escala original tomando os anti-logaritmos dos limites dos logaritmos resultantes e multiplicar por 100%. A potência estimada do lote de AG SF não foi inferior a 80% e não foi superior a 125% da potência afirmada. Os limites de confiança do erro ($P=0,95$) da estimada potência foram inferiores a 70% e não foram superiores a 143% da potência afirmada. Se o lote estivesse fora dos limites acima, o teste *in vitro* era repetido em duplicado. Se os resultados de ambos os novos testes estivessem dentro das especificações, o lote era aceitável. Se um novo teste falhasse, o lote era rejeitado.

Documentação

A contagem de células de NL e o molde de placas de ELISA foram registados. Foram preenchidos os registos originais do leitor de ELISA e o formulário de resultados.

EXEMPLO 2: DESENVOLVIMENTO DO PROCEDIMENTO PADRÃO DO EXEMPLO 1

Experiência 2A: Perfil de citocinas segregadas por células T específicas de AG PR

As células de NL foram derivadas de ratinhos fêmeas (SJL x BALB/C)F1 imunizados com 250 µg de AG PR em CFA 9-11 dias antes, foram cultivadas na presença de várias concentrações de AG PR. As células foram incubadas com AG PR durante 18-24 horas a 37°C numa incubadora de CO₂ a 5%, humidificada. Subsequentemente, as culturas foram centrifugadas e os sobrenadantes colhidos e ensaiados quanto a citocinas através de ELISA.

O ELISA foi efectuado utilizando anticorpos biotinilados específicos para a citocina e conjugado com estreptavidina-

peroxidase de rábano (HRP) para detecção. Cada placa corrida incluiu um controlo de branco (primeiro e segundo anticorpos sem o padrão de citocina). Cada placa corrida incluiu também amostras de controlo de qualidade (CQ) (três concentrações de padrão de citocina dentro do intervalo linear do ensaio). Cada teste *in vitro* incluiu um controlo positivo (Con A, um estimulante de células T não específico) e um controlo negativo (sem AG ou qualquer outro antigénio). Todas as citocinas foram medidas após 18-24 horas de incubação. Os níveis de TGF- β , IL-10 e IL-4 foram testados novamente após 72 horas de incubação. Os resultados são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Perfil de citocinas

Citocina	Níveis de secreção
IL-2	++
INF- γ	++
IL-6	+
IL-10	+
IL-13	-
TGF- β	-
IL-4	-
TNF- α	-

Na Tabela 4, os níveis máximos medidos para cada citocina são apresentados em unidades arbitrárias: (-) < limite de detecção; (+) até - 400 pg/mL; e (++) > 400 pg/mL. A Tabela 4 mostra que em resposta a AG PR em cultura, as células de NL segregaram IL-2, INF- γ , IL-10 e IL-6, enquanto TNF- α , IL-4, IL-13 e TGF- β não foram detectados no meio de cultura. Estes resultados indicam que as citocinas produzidas pelas células T específicas de AG PR são do tipo Th₀. Deve notar-se que foi observado um perfil Th₀ em diferentes protocolos de imunização, i.e., imunização com IFA ou com doses baixas de AG.

Uma vez que IL-2 é um bom marcador para activação de células T, e uma vez que a secreção de IL-2 em resposta a

AG PR foi muito reprodutível, com uma relação dose-resposta linear, a IL-2 pareceu ser a citocina óptima para medir a activação de células T.

Experiência 2B: Optimização do procedimento de imunização

Foram efectuadas várias experiências para estabelecer o protocolo de imunização óptimo. A primeira experiência testou o efeito da dose de AG PR (antigénio de imunização) em respostas de células T nos NL e no baço. Dois grupos de 10 ratinhos cada foram imunizados com 250 µg de AG em CFA (grupo 1) (tal como no teste de bloqueio de EAE) ou com 10 µg de AG em CFA (grupo 2). Foram preparadas culturas primárias dos NL e dos baços dos ratinhos imunizados. As culturas foram incubadas de um dia para o outro com várias doses de AG PR e a partir daí os meios de cultura foram colhidos e ensaiados quanto a IL-2 tal como na Experiência 2A. Os resultados na Fig. 4 mostram claramente que em ambos os protocolos de imunização os níveis de IL-2 segregados de células de NL são elevados em comparação com os segregados de células do baço. Com base nestes resultados foi decidido utilizar culturas primárias de células de NL para o ensaio. Adicionalmente, as doses de AG PR injectadas em ratinhos não afectou a resposta de células T em cultura. Tanto as células de NL como as de baço segregaram quantidades semelhantes de IL-2 independentemente da dose de imunização de AG PR. Isto indica que o procedimento de imunização é robusto, e que até grandes variações na dose de imunização de AG PR não afectam o resultado imunológico.

Para maior optimização do protocolo de imunização, um grupo foi injectado com 250 µg de AG PR em CFA e o segundo grupo com 10 mg de AG em ICFA. A dose de AG PR no segundo grupo foi mais elevada uma vez que foi utilizado ICFA, um adjuvante mais fraco. Dez dias depois, a resposta das células de NL de ambos os grupos a AG PR foi testada *in*

vitro. A Fig. 5 mostra que a imunização com 250 µg de AG PR em CFA induziu uma resposta muito mais forte na cultura, embora tivesse sido utilizada uma dose muito inferior de antígeno.

Com base nestas descobertas e no facto de que 250 µg/ratinho de AG em CFA são muito eficazes no bloqueio de EAE (bloqueando pelo menos 80% de EAE nesta estirpe de ratinho), 250 µg/ratinho de AG em CFA parece ser a dose óptima.

Células T específicas foram habitualmente geradas em aproximadamente 10 dias, após uma única imunização com CFA. A Fig. 6 mostra a resposta das células de NL a AG PR em cultura, preparadas 9, 10 e 11 dias após a imunização. Uma vez que a resposta à dose da secreção de IL-2 era semelhante em todos os dias, o período de imunização pode durar 9-11 dias.

Experiência 2C: Optimização das condições de teste *in vitro*

Foram efectuadas várias experiências para estabelecer o protocolo óptimo para a reacção *in vitro*. Estes estudos incluíram a optimização das condições de cultura, do tempo de incubação, da estabilidade de IL-2 em amostras de teste e estabilidade de AG PR a -20°C.

i) Meios de cultura

As culturas de células linfóides de ratinho são habitualmente mantidas em meio RPMI, suplementado com 1% de soro normal de ratinho. O soro normal de ratinho pode conter IL-2 endógena que pode ser detectada através de anticorpos monoclonais anti-IL-2 de ratinho utilizados no estojo de ELISA. Adicionalmente, a utilização de diferentes lotes de soro normal pode aumentar as variações inter-dia

do teste *in vitro*. Para evitar contaminação cruzada com IL-2 endógena de ratinho, e reduzir as variações inter-dia do método, as respostas das células T específicas de AG foram testadas em 4 meios de cultura diferentes: 1) RPMI + soro normal de ratinho (NMS) a 1%; 2) RPMI + soro fetal bovino (FBS) a 1% (a IL-2 bovina não é reconhecida pelo anti-IL-2 de ratinho utilizado no estojo de ELISA); 3) Biotarget (meio sem soro produzido exclusivamente por BeitHaemek, Israel); e 4) DCCM1 (meio sem soro produzido por vários fabricantes).

A Fig. 7 mostra os resultados de uma experiência representativa que compara a resposta de células de NL a AG PR em diferentes meios de cultura. As melhores respostas foram observadas quando foram utilizados meios sem soro. O intervalo de resposta à dose foi deslocado para a esquerda na ausência de soro. Isto pode ser explicado por estudos anteriores mostrando que AG se liga a albumina e a outras proteínas do soro. Esta ligação pode reduzir a disponibilidade de AG em cultura a interações com APCs, e serem assim necessárias concentrações de AG mais elevadas para estimular as células T. Com base nestes resultados, o meio óptimo parece ser o meio DCCM-1.

ii) Cinética da secreção de IL-2

IL-2 é um factor de crescimento autócrino e parácrino que é essencial para a proliferação clonal de células T e para as propriedades funcionais das células B e dos macrófagos. Após estimulação da cultura com AG RS, IL-2 é segregada pelas células T específicas de AG activadas e é subsequentemente consumida pelas células de NL. Foram efectuados estudos cinéticos da secreção de IL-2 numa tentativa de determinar o tempo óptimo (pico) para a colheita dos sobrenadantes, após estimulação com AG. Células de NL foram cultivadas e incubadas com várias

concentrações de AG PR a 37°C numa incubadora de CO₂ humidificada. Nos intervalos indicados na Fig. 8, foram amostradas alíquotas e as células foram removidas através de centrifugação. Os sobrenadantes foram mantidos a 20°C e no final da experiência foram ensaiados quanto a IL-2 através de ELISA.

A Fig. 8 mostra que o pico dos níveis de IL-2 no meio de cultura está entre 18-21 horas. A redução nos níveis de IL-2 nas amostras colhidas de 24-48 horas pode ser explicada pelo consumo de IL-2 pelas células de NL. Assim, o tempo óptimo para a colheita do sobrenadante parece ser após 18-21 horas de incubação.

iii) Medição de citocinas

O método baseia-se em medições precisas de IL-2 em amostras de AG PR e amostras de teste. Durante as experiências, os níveis de IL-2 foram medidos através de OptEIA (Pharmingen, Cat. # 2614KI) - uma estojos de ELISA específico para IL-2 de ratinho. Este estojos de ELISA é muito sensível e os resultados são precisos e reprodutíveis.

iv) Estabilidade de IL-2 em amostras de teste a -20°C

Na maioria das experiências efectuadas, os meios de cultura foram colhidos e mantidos a -20°C antes de serem analisados através de ELISA. Estudos preliminares da estabilidade de IL-2 em meio de cultura mostram que a citocina é estável durante uma semana a -20°C (Fig. 9). Por essa razão, o meio de cultura das amostras de teste *in vitro* pode ser mantido a -20°C durante até uma semana antes da medição de IL-2. Os resultados desta experiência demonstraram também que os resultados de ELISA são muito reprodutíveis - os níveis de IL-2 medidos nas amostras foram praticamente idênticos em

duas corridas de placas de ELISA efectuadas em dois dias diferentes separados por uma semana.

v) Estabilidade da solução de AG PR a -20°C

Para testar a estabilidade da solução de AG PR a -20°C, a resposta à dose de uma solução de AG PR foi testada imediatamente após a preparação, e após armazenamento durante 5 meses a -20°C. A Fig. 10 mostra que praticamente não existe diferença nas curvas de resposta à dose da solução de AG PR antes e após armazenamento durante 5 meses a -20°C. Por essa razão, alíquotas da solução de AG PR podem ser preparadas e mantidas a -20°C durante pelo menos 5 meses antes da utilização.

Experiência 2D: Determinação do Intervalo Linear das Curvas de Calibração de AG PR

A validação estatística foi realizada com base nas curvas de calibração de AG PR calculadas e avaliadas separadamente para cada uma das 21 placas recebidas para análise. Estas 21 amostras foram reunidas em momentos diferentes ao longo de um período de aproximadamente quatro meses. O intervalo de concentrações de AG para as dadas placas variou de 0,25 a 50 µg/mL. As seguintes características de validação derivadas das curvas de calibração de AG PR constituíram a principal preocupação das análises:

1. Transformação óptima para assegurar limites mais amplos do intervalo linear;
2. Determinação dos limites do intervalo linear;
3. Critérios globais para aceitação de uma curva de calibração;
4. Estimativa da exactidão e precisão do ensaio;
5. Avaliação da confiança do duplicado (ver o parágrafo abaixo).

A natureza das experiências era tal que houve tipicamente 3 replicados (triplicados) em cada ponto de calibração. No entanto, nalguns casos, quando não podia ser proporcionada

uma medição em triplicado, a avaliação da confiança do duplicado tornou-se essencial.

Linearidade da Relação da Resposta à Dose de AG

A base da maioria dos aspectos da discussão de validação apresentada abaixo foi um modelo de regressão linear que relacionou a concentração de IL-2 (pg/mL) com a concentração de AG (µg/mL). A assumpção da linearidade desta relação foi necessária para o ajuste apropriado do modelo de regressão linear. Os dados foram representados num gráfico numa escala Linear-Linear. A mesma relação foi transformada em escala Log-Log, bem como numa escala Log-Linear, e numa escala Log-Raiz Quadrada. A transformação Log-Log demonstrou as características lineares mais adequadas. Assim, a forma escolhida do modelo de regressão foi a Log-Log:

$$\text{Log}_{10} (\text{conc. de IL-2}) = \alpha + \beta * \text{Log}_{10} (\text{conc. de AG}) + \text{erro}$$

A resposta variável foi a média transformada em logaritmo dos 3 replicados medidos em cada ponto de calibração. Este modelo foi ajustado a cada amostra de calibração e as estatísticas apropriadas (R^2 , intercepção e declive) foram calculadas para cada curva ajustada. O valor de R^2 reflectiu a razão da soma residual dos quadrados (SRQ) para a soma total dos quadrados (STQ) através da fórmula:

$$R^2 = 1 - \text{SRQ} / \text{STQ}$$

Determinação do Intervalo Linear

O intervalo linear foi determinado com base nos seguintes critérios:

1. Inspeção visual de $\log_{10}$ (conc IL-2) vs. $\log_{10}$ (conc AG) em gráfico;

2. Diagnósticos da influência da regressão, tal como a distância estatística de Cook conhecida na técnica;
3. A avaliação da variação dos valores de precisão e exactidão calculados para as curvas de calibração para várias potenciais definições do intervalo linear proporcionou uma avaliação visual da linearidade da relação. Não houve evidência de não linearidade da relação dentro do intervalo linear escolhido de 1-25 µg/mL.

Experiência 2E: Determinação dos Critérios para a Curva Padrão de AG PR

Os parâmetros de validação derivados das curvas de calibração de AG PR, ajustados dentro dos limites seleccionados (1-25 µg/mL) do intervalo linear, foram determinados como sendo os seguintes:

1. R^2 dos ajustes da regressão linear de $\log_{10}$ (conc IL-2) a $\log_{10}$ (conc AG) para cada placa no estudo;
2. Declives e intercepções para estes ajustes de linha recta;
3. Exactidão calculada a cada ponto de calibração para cada placa; e
4. Precisão calculada a cada ponto de calibração para cada placa.

Para calcular a exactidão e precisão, cada curva de calibração foi utilizada para calibrar (cálculo inverso) as concentrações de AG dados os valores da concentração de IL-2:

$$X_{i, \text{ inv}} \approx 10^{(\log_{10} (\text{Conc de IL-2})_i - \alpha) / \beta}$$

$i = 1, 2, 3$ - índice do triplicado.

A medida básica de (in)exactidão utilizada foi a diferença percentual entre a média das concentrações estimadas e a verdadeira concentração nas amostras em triplicado:

$$\text{inexactidão} = \left(\frac{\text{Média}(X_{i-\text{inv}}) - \text{conc. AG}}{\text{conc. AG}} \right) * 100\%.$$

A medida básica de precisão utilizada foi o desvio padrão relativo (DPR ou CV) das concentrações estimadas em triplicado:

$$\text{precisão} = \text{CV}(X_{i-\text{inv}}) = \left\{ \frac{\text{Desv. P.}(X_{i-\text{inv}})}{\text{Média}(X_{i-\text{inv}})} \right\} * 100\%.$$

O objectivo da análise foi propor critérios de aceitação para a curva de calibração ajustada que assegurassem que a exactidão e precisão do método eram adequadas. Os critérios de aceitação foram baseados no R^2 e no declive da curva de calibração do AG PR. Cerca de 80% das placas puderam ser caracterizadas por pequenos valores de inexactidão (< 13%) e por boa precisão (1,1% - 6,7%). Para estas 16 curvas padrão "bem comportadas", foram obtidos os seguintes resultados:

1. Elevados valores de R^2 (>0,98);
2. Valores de declive relativamente elevados, reflectindo relações de resposta à dose (>0,78 em 15 das 16 placas).

Uma vez que a maioria das curvas de calibração eram caracterizadas por R^2 relativamente elevados (média = 0,99) e por declives relativamente íngremes (média = 0,87), em contraste com as placas excluídas que tiveram tanto R^2 relativamente baixos (média = 0,94) como declives bastante planos (média = 0,72), os critérios globais de aceitação para as curvas de calibração foram considerados em termos de R^2 e declive. A regra simples definindo os parâmetros de aceitação foi baseada no cálculo dos pontos de separação para o declive e o R^2 separadamente e situou-os a meio entre o valor máximo para as curvas rejeitadas (máx_ R^2 = 0,95 máx_declive = 0,77) e o valor mínimo para as curvas

aceites ($\text{mín}_R^2 = 0,98$ $\text{mín}_{\text{declive}} = 0,77$). Assim, os critérios de aceitação foram derivados como se segue:

1. $R^2 \geq 0,97$;
2. Declive $\geq 0,77$.

Estes critérios foram aplicados a pelo menos cinco concentrações diferentes (triplicado) para ajuste à curva de calibração dentro do intervalo 1-25 $\mu\text{g/mL}$ de concentração de AG. Adicionalmente, o intervalo de valores de intercepção foi entre 1,42 - 1,78, média = 1,58. Este intervalo foi semelhante para as 16 placas elegíveis e as 5 removidas.

A exactidão e precisão foram calculadas para cada curva, e para cada concentração entre as da placa. Foi também calculada a média destes valores individuais (para cada curva e concentração) para:

1. Diferentes concentrações para cada curva;
2. Curvas diferentes para cada concentração; e
3. Para todas as curvas e concentrações.

A conclusão relevante foi que para as curvas de calibração de AG PR baseadas em pelo menos cinco pontos de calibração diferentes no intervalo linear de 1-25 $\mu\text{g/mL}$, quando a curva de concentração era restringida a ter $R^2 \geq 0,97$ e declive $\geq 0,77$, a exactidão e precisão médias resultantes foram estimadas como:

1. O valor médio ($\pm$ DP) de exactidão para o método foi de: $8,0\% \pm 2,3\%$; e
2. O valor médio ($\pm$ DP) de precisão para o método foi de: $2,9\% \pm 1,7\%$.

Avaliação da Confiança das Curvas de Calibração de AG PR com Base em Medições em Duplicado

Foi efectuada uma comparação da estatística descritiva da exactidão e precisão do ensaio para avaliar a confiança das curvas de calibração de AG PR ajustadas utilizando medições em duplicado em cada ponto de calibração. Adicionalmente, foram estudados os valores individuais de exactidão e precisão (para cada curva e concentração) para todas as três selecções possíveis de medições em duplicado, a partir do dado triplicado. Quando nos concentrámos nas curvas que satisfizeram os critérios de aceitação descritos na secção anterior e se ajustaram dentro dos limites do intervalo linear definido de 1-25 µg/mL, foi evidente que quando, por alguma razão, não pode ser proporcionada uma medição em triplicado, esta pode ser substituída com sucesso por medição em duplicado.

Tabela 5: Resumo da Estatística Descritiva da Exactidão e Precisão

	Triplicado		Duplicado (1,2)		Duplicado (1,3)		Duplicado (2,3)	
	Exactidão	Precisão	Exactidão	Precisão	Exactidão	Precisão	Exactidão	Precisão
Média	8,00	2,93	8,13	2,53	7,98	2,88	8,40	2,40
D.P.	2,31	1,72	2,80	1,66	2,45	2,13	2,79	1,53
Mín.	5,23	1,10	4,93	0,95	5,21	0,93	4,97	0,81
Máx.	12,79	6,67	12,51	6,33	12,44	9,24	13,41	5,99

A média ($\pm$ DP) da exactidão e precisão do método com base em triplicados foi de 8,0% $\pm$ 2,3% e 2,9% $\pm$ 1,7%, respectivamente (Tabela 5).

A média ($\pm$ DP) da exactidão e precisão do método com base em duplicados foi de:

1. Exactidão: 8,1% $\pm$ 2,8%; Precisão: 2,5% $\pm$ 1,7%;
2. Exactidão: 8,0% $\pm$ 2,5%; Precisão: 2,9% $\pm$ 2,1%; e
3. Exactidão: 8,4% $\pm$ 2,8%; Precisão: 2,4% $\pm$ 1,5%.

Experiência 2F: Determinação da Relação Estatística

Verificou-se que a (in)exactidão média do método é de 8,0% com DP=2,3%. O objectivo foi desenvolver um teste de confiança para a comparação dos declives de duas linhas log(dose)-log(resposta) de um novo lote de AG vs. AG PR. O teste teve em consideração a (in)exactidão do método acima mencionado. O limite mais elevado da região de tolerância individual aproximada de 95% para a (in)exactidão média do método serviu como valor limiar: Média + 2*DP = 12,6%. Assim, variações dentro do intervalo $\pm 12,6\%$ foram consideradas não significativas.

Segue-se uma explicação matemática completa da relação entre β^* (o declive da linha do lote), β (o declive da linha do padrão) e o valor de (in)exactidão mais elevado permitido. Sem perder a generalidade, apenas o caso onde $\beta^* > \beta$ será provado em detalhe (devido à simetria existente, a extensão da prova para o caso onde $\beta^* < \beta$ é óbvia). O valor da dose calculado inversamente, para uma dada log(resposta) foi:

$$X_{inv} = 10^{(Y-\alpha)/\beta} \text{ onde } Y = \log_{10} (\text{concentração de IL-2}).$$

A fórmula para o cálculo da (in)exactidão foi de:

$$(\text{in})\text{exactidão} = [(10^{(Y-\alpha)/\beta} - X_{\text{verdadeiro}}) / X_{\text{verdadeiro}}] * 100\%.$$

Y_{baixo} e Y_{elevado} foram os valores mais baixo e mais elevado de log(resposta) permitidos pela (in)exactidão mais elevada permissível de $\pm 12,6\%$.

Assim, a região onde a hipótese de igualdade dos declives seria aceite era:

$$\left\{ \begin{array}{l} [(10^{(Y_{\text{baixo}} - \alpha)/\beta} - X_1)/X_1] \cdot 100\% \geq -12,6\% \\ [(10^{(Y_{\text{elevado}} - \alpha)/\beta} - X_2)/X_2] \cdot 100\% \leq -12,6\% \end{array} \right.$$

$$\left\{ \begin{array}{l} 10^{(Y_{\text{baixo}} - \alpha)/\beta}/X_1 \geq 0,874 \\ 10^{(Y_{\text{elevado}} - \alpha)/\beta}/X_2 \leq 1,126 \end{array} \right.$$

Assim, as fronteiras da igualdade dos declives foram:

$$\left\{ \begin{array}{l} Y_{\text{baixo}} = \alpha + \beta \cdot \log(X_1 \cdot 0,874) \\ Y_{\text{elevado}} = \alpha + \beta \cdot \log(X_2 \cdot 1,126) \end{array} \right.$$

O declive de uma linha recta foi calculado como se segue:

$$\beta^* = (Y_{\text{elevado}} - Y_{\text{baixo}})/(\log X_2 - \log X_1) = [\beta \cdot \log([X_2/X_1] \cdot [1,126/0,874])] / \log(X_2/X_1)$$

$$\beta^* = (\beta \cdot \log(1,288))/\log(X_2/X_1) = \beta \cdot (1 + \log(1,288)/\log(X_2/X_1))$$

Assumindo para o caso particular em consideração que $X_2/X_1 = 2$ (para níveis de dose de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$), β^* foi calculado como se segue:

$$\beta^* = \beta \cdot (1 + \log(1,288)/\log 2) = \beta \cdot 1,365$$

Combinando este resultado com o obtido para o caso simétrico onde $\beta^* < \beta$, os limites foram calculados como:

$$\left\{ \begin{array}{l} \beta^* \leq \beta \cdot 1,365 \\ \beta^* \geq \beta \cdot 0,635 \end{array} \right.$$

Nos dados oferecidos, todos os valores do declive estavam dentro dos limites críticos correspondentes, significando que não foi observado nenhum desvio da assunção de paralelismo.

Uma vez aceite um lote como estatisticamente válido (provada a existência de linearidade e paralelismo), foi estimada a razão das potências da preparação de teste relativamente ao padrão. Isto foi feito num ensaio de linhas paralelas através do ajuste de linhas rectas paralelas aos dados e determinação da distância horizontal entre elas:

$$M = \log \rho = \frac{\bar{Y}_T - \bar{Y}_S}{B} - (\bar{X}_T - \bar{X}_S) ;$$

onde ρ denominava a potência, $\bar{Y}_S, \bar{Y}_T, \bar{X}_S, \bar{X}_T$ eram a média de log(respostas) e log(doses) das preparações de padrão e de teste, respectivamente. B - era um declive comum para as linhas de log(dose)-log(resposta) de padrão e de teste. A estimativa dos quadrados mínimos do declive comum - B era uma média ponderada dos quadrados mínimos estimados de dois declives separadamente da linha do padrão e da linha do teste. Tomando o anti-logaritmo da expressão de cima, foi-se capaz de obter um ponto estimado da "verdadeira % de potência" de uma preparação de teste relativamente ao seu padrão:

$$\text{Potência} = 10^{\frac{\bar{Y}_T - \bar{Y}_S}{B} - (\bar{X}_T - \bar{X}_S)} \cdot 100\% .$$

EXEMPLO 3: VALIDAÇÃO DO PROCEDIMENTO PADRÃO DO EXEMPLO 1

O objectivo da análise, apresentada abaixo, foi estabelecer especificações de divulgação validadas para a potência relativa de um lote de AG. Um lote de AG foi considerado válido, se nos seguintes critérios, com base em inferência estatística, fosse verificado:

1. Nenhuma violação das suposições envolvidas na abordagem de análise do bioensaio:

- (a) Independência e normalidade do log(respostas);
 - (b) Homogeneidade da variância do log(respostas);
 - (c) Nenhum valor extremo;
 - (d) Paralelismo (ausência de significância do teste de razão dos declives);
2. A estimativa pontual da potência relativa está dentro de um intervalo pré-especificado: 80% - 125%; e
3. Os Limites de Confiança a 95% para o valor da "verdadeira potência relativa" estão dentro de um intervalo de confiança pré-definido mais amplo: 70% a 143%.

O modelo assumiu que as preparações de padrão e teste se devem comportar como se uma fosse uma simples diluição da outra. Isto significa que as linhas de log(dose)-resposta para as duas preparações não se devem desviar significativamente da linearidade e do paralelismo. Assim, um anti-logaritmo da deslocação horizontal constante entre estas linhas rectas foi capaz de servir como estimativa da razão das potências. Estes dois requisitos, linearidade e paralelismo, constituíram um conceito da validade do ensaio. A verificação da validade foi um pré-requisito ao cálculo da potência relativa e dos seus limites de confiança.

A estimativa do erro aleatório foi necessária para o cálculo dos limites de confiança para o valor verdadeiro da potência relativa. Esta medida foi obtida através da implementação da técnica estatística conhecida como "Análise de Variância" (ANOVA). Por essa razão, as assunções estatísticas clássicas do ANOVA tiveram de ser satisfeitas. Os requisitos para a análise estatística de um modelo de bioensaio de linhas paralelas foram como se segue:

1. As respostas foram independentemente distribuídas normalmente pelos seus valores esperados;
2. A variância da resposta não foi afectada pelo valor médio da resposta;
3. Não houve valores extremos;
4. A relação entre o $\log(\text{dose})$ e a resposta pôde ser representada por uma linha recta ao longo do intervalo de doses; e
5. A linha recta da preparação de teste foi paralela à do padrão.

Os dados da análise do lote foram obtidos a partir de diferentes experiências efectuadas em dias diferentes por operadores diferentes. Os ensaios de validação do procedimento padrão do Exemplo 1 foram realizados através de uma série de experiências, envolvendo cada uma: 1) imunização de ratinhos com 250 μg de AG PR em CFA; 2) preparação de uma cultura primária das células de NL 9-11 dias após a imunização; 3) incubação das células de NL com várias concentrações de AG PR e com amostras de teste; 4) colheita do meio de cultura e análise dos níveis de IL-2 através de ELISA; 5) representação gráfica de uma curva de AG PR com base nas medições de IL-2 em triplicado efectuadas a 6 níveis de dose de 1-25 $\mu\text{g/mL}$; e 6) comparação da resposta das células T a cada amostra de teste com a resposta ao lote de PR (em triplicado) a duas concentrações dentro do intervalo linear (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$). A %CV foi também calculada para cada triplicado para detectar quaisquer problemas associados a variabilidade entre os triplicados (normalmente, a %CV entre triplicados não deve exceder 10-15%). Para os dados oferecidos, não foram detectadas violações das condições.

As características de validação utilizadas para proporcionar um conhecimento global das capacidades do

procedimento analítico foram: linearidade, intervalo, exactidão, precisão, especificidade e robustez. Os critérios de validação e as análises basearam-se nas linhas orientadoras de consenso de ICH, "Validation of Analytical Procedures: Methodology", Novembro de 1996 (CPMP/ICH/281/95). Os métodos estatísticos recomendados nas linhas orientadoras de "European Pharmacopoeia" foram adaptados aos dados oferecidos para fins de análise.

Experiência 3A: Linearidade e Intervalo

Em cada teste *in vitro*, uma curva de resposta à dose do lote de AG PR foi utilizada para calcular a resposta relativa das células às amostras testadas. Cada curva de calibração incluiu pelo menos cinco pontos (sem zero). Foram representadas graficamente e avaliadas para cada placa vinte e uma curvas de calibração recolhidas de diferentes testes *in vitro*, efectuados durante os estádios de desenvolvimento e validação.

A análise estatística dos dados revelou que os gráficos de $\log_{10}$ (concentração de IL-2) versus $\log_{10}$ (concentração de AG PR) proporcionaram o melhor ajuste linear. O intervalo linear emergiu principalmente através de inspecção visual e avaliação da exactidão e precisão dos pontos de calibração. A %DPR foi calculada para cada triplicado para detectar quaisquer problemas associados à variabilidade entre triplicados (normalmente, a %DPR entre triplicados não deve exceder 10-15%). O intervalo da curva de AG PR foi especificado entre 1-25 µg/mL.

Com base nestas análises, a curva de AG PR deve ser constituída por pelo menos 6 pontos de calibração, um com concentração zero (controlo negativo) e pelo menos 5 concentrações de AG PR no intervalo entre 1 e 25 µg/mL. A

regressão linear de $\log_{10}$ (concentração de IL-2) versus $\log_{10}$ (concentração de AG PR) deve ter um $R^2 \geq 0,97$ e um declive $\geq 0,77$.

Experiência 3B: Exactidão

A exactidão do método foi estabelecida ao longo do intervalo linear especificado da curva de AG PR. A análise estatística dos dados revelou que a exactidão média do método era de: $8,0\% \pm 2,3\%$.

Experiência 3C: Precisão

A medida básica de precisão utilizada foi o desvio padrão relativo (DPR) da estimativa de concentração em replicado (habitualmente triplicado).

O DPR foi estabelecido ao longo do intervalo linear das curvas de AG PR. A análise estatística dos dados revelou que a precisão média do método foi de $2,9\% \pm 1,7\%$. A confiança das medições em duplicado foi equivalente às dos triplicados. Por essa razão, quando um dos três replicados era identificado como um valor extremo, o valor extremo era omitido e eram aceites os resultados das medições em duplicado.

Experiência 3D: Reprodutibilidade do Método

A resposta das células T específicas de AG a um lote de AG SF foi medida repetidamente, 3 vezes, no mesmo teste *in vitro*. Três pesos do mesmo lote foram, cada um, diluídos até 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ e incubados com as células T específicas de AG. Os níveis de IL-2 no meio de cultura das amostras de teste e das amostras de AG PR, foram medidos através de ELISA em triplicado. A % de potência e os limites de confiança a 95% das células para cada replicado foram

calculados relativamente ao AG PR. A Tabela 6 mostra a % de resposta calculada para cada replicado.

Tabela 6: Reprodutibilidade do Método

Amostra #	Conc. de AG SF (µg/mL)	% de Potência			Méd. N=6	DP	DPR	Limites de confiança de 95% (Limite Inferior-Limite Superior)
1	5	75	80	74	77	3,3	4,2	67-89
	10	73	79	81				
2	5	83	83	92	84	5,0	5,9	73-97
	10	80	79	88				
3	5	72	74	71	76	5,2	5,2	65-88
	10	80	78	79				

Experiência 3E: Precisão intermédia

A % de resposta de um lote de AG SF foi testada em 3 testes *in vitro* diferentes, efectuados em dias diferentes, por 3 investigadores diferentes do mesmo laboratório. A Tabela 7 resume a % de potência e os limites de confiança a 95% determinados para este lote nas 3 experiências repetidas.

Tabela 7: Precisão Intermédia

Amostra #	Conc. de AG SF (µg/mL)	% de Potência			Méd. N=6	DP	DPR	Limites de confiança a 95% (Limite Inferior-Limite Superior)
1	5	85	86	83	83	3,1	3,7	71-97
	10	77	84	84				
2	5	90	86	87	86	3,0	3,7	79-94
	10	82	84	89				
3	5	75	80	74	77	3,3	4,2	65-88
	10	73	79	81				

Experiência 3F: Reprodutibilidade do método

A reprodutibilidade do método foi avaliada por meio de estudo inter-laboratórios. A % de resposta ao lote de AG SF foi testada em duas experiências diferentes, efectuadas em 2 laboratórios diferentes, utilizando diferentes analistas,

equipamento e reagentes. A Tabela 8 resume os resultados de ambos os laboratórios.

Tabela 8: Reprodutibilidade do Método

	Lab 1	Lab 2
% de Potência Média $\pm$ DPR	86 $\pm$ 3,5	83 $\pm$ 5,0
Limites de Confiança a 95%	79 - 94	78 - 90

Com base nas experiências acima, pode concluir-se que o teste *in vitro* é reprodutível.

Experiência 3G: Especificidade

A discriminação do método foi testada a 3 níveis: 1) discriminação entre as amostras incubadas com/sem AG PR (efeito de matriz); 2) discriminação entre AG PR e outras proteínas e péptidos relacionados e não relacionados, incluindo AG SF; e 3) discriminação entre AG PR e copolímeros relacionados com AG nos quais as sequências peptídicas foram deliberadamente modificadas.

i) Reconhecimento de AG PR por células T específicas de AG PR (efeito de matriz)

Células T específicas de AG foram induzidas através de imunização de ratinhos fêmeas (SJL x BALB/C)F1 com 250 g de AG PR em CFA. Esta dose de AG é rotineiramente utilizada para testes da actividade biológica de lotes de AG nesta estirpe de ratinho utilizando o teste de bloqueio de EAE. O grupo de controlo nesta experiência foi injectado apenas com CFA. Dez dias após a imunização, células de NL foram removidas de ambos os grupos de ratinhos. As células foram incubadas com AG PR durante 18-24 horas a 37°C numa incubadora de CO₂ a 5% humidificada.

Subsequentemente, as culturas foram centrifugadas e os sobrenadantes colhidos e ensaiados quanto a interleucina-2

(IL-2, uma citocina segregada por células T activadas) através de ELISA utilizando anticorpos biotinilados específicos para IL-2 e conjugado com estreptavidina-peroxidase de rábano (HRP) para detecção (Fig. 1). Cada placa corrida incluiu branco de controlo (primeiro e segundo anticorpos sem a citocina padrão). Cada placa corrida incluiu também amostras de controlo de qualidade (CQ) (três concentrações de citocina padrão dentro do intervalo linear do ensaio). Cada teste *in vitro* incluiu um controlo positivo (Con A, um estimulante de células T não específico) e um controlo negativo (sem AG nem qualquer outro antigénio). A Fig. 2 mostra que as células de NL de ratinhos imunizados com AG PR segregam IL-2 dependentemente da dose em resposta a AG PR em cultura, enquanto as células de NL dos ratinhos de controlo não respondem a AG PR em cultura. Os níveis de IL-2 nas amostras de controlo negativo estão habitualmente abaixo ou próximos do limite de detecção de ELISA (aproximadamente 3 pg/mL). Estes níveis de IL-2 estão sempre abaixo dos níveis segregados pelo ponto de calibração mais baixo de AG PR (1 µg/mL). Estes resultados indicam que a secreção de IL-2 pelas células T específicas de AG é dependente de AG.

ii) Discriminação entre antigénios relacionados e não relacionados

A discriminação entre antigénios relacionados e não relacionado (proteínas e péptidos simples) foi demonstrada através do teste da resposta das células T específicas de AG PR a vários antigénios *in vitro*. Uma cultura primária de células de NL derivou de ratinhos fêmeas (SJL x BALB/C)F1 imunizados 9-11 dias antes com 250 µg de AG PR em CFA. A cultura primária foi incubada de um dia para o outro com AG PR e com vários outros antigénios a 37°C numa incubadora de CO₂ a 5% humidificada. Depois, as culturas foram

centrifugadas e os sobrenadantes colhidos e ensaiados quanto a IL-2 através de ELISA tal como na Experiência 3G(i).

A Tabela 9 mostra que neste sistema experimental as células T específicas de AG não responderam nem a MBP humana (proteína básica da mielina), nem ao péptido imunodominante da MBP pos. 87-99 (um péptido encefalitogénico), nem ao seu análogo pos. 87-99_{Ala 96} (um péptido supressor de EAE). A lisozima, uma proteína básica não relevante, também não foi reconhecida pelas células T específicas de AG. TV-35 e TV-109 eram péptidos com um peso molecular de 3757 e 11727, respectivamente (Publicação Internacional PCT N°. WO 00/18794). Estes péptidos tinham uma sequência definida constituída pelos mesmos quatro aminoácidos de AG (Ala, Glu, Lys, Tyr), na mesma razão molar que em AG. As células de NL específicas de AG PR não responderam a TV-35, e tiveram uma reactividade cruzada muito baixa com TV-109. Estes resultados podem ser explicados pela observação de que a imunização com AG PR induziu a formação de uma mistura de células T com diferente especificidade para os múltiplos epitopos de células T presentes em AG. TV-35 e TV-109 podem partilhar sequências comuns com AG, no entanto, uma incubação das células T específicas de AG com um único péptido causou provavelmente apenas uma estimulação parcial de uma pequena fracção das células específicas de AG em cultura. Assim, a resposta global das células T (secreção de IL-2) ficou abaixo ou próximo dos limites de detecção.

Tabela 9: Especificidade de células de NL específicas de AG

<u>PR</u>	
Antigénio	% de Potência ¹
AG PR	100
Lisozima	0
MBP Humana	0
MBP pos. 87-99	0
MBP pos. 87-99 _{Ala 96}	0
TV-35	0
TV-109	17
1	
$\% \text{ de Potência} = \frac{\text{Concentração de IL-2 no meio de cultura do antigénio X100}}{\text{Concentração de IL-2 no meio de cultura de AG PR}}$	

O teste *in vitro* foi sensível ao peso molecular médio (PM) do lote de AG. A Fig. 11 mostra a resposta das células específicas de AG PR a AG PR (PM = 7900) e a lotes de AG SF diferindo no seu PM médio. Tal como se pode observar, a resposta correlacionou-se geralmente com o PM médio; quanto mais elevado o PM médio, maior a resposta. No entanto, deve observar-se que as especificações divulgadas para o PM médio de AG SF estão entre 4700-10000, e que níveis semelhantes de IL-2 foram segregados em resposta a lotes de SF com PM médio dentro das especificações (Fig. 11). Estes resultados indicam que o método era altamente específico para AG e sensível a alterações no PM médio de AG.

iii) Reconhecimento de AG substância fármaco (SF) e do produto fármaco (PF) Copaxone® por células T específicas de AG PR

Nove a onze dias após a imunização de ratinhos fêmeas (SJL x BALB/C)F1 com 250 µg de AG PR em CFA, as células de NL foram removidas e cultivadas com várias doses de lote de AG PR (o antigénio imunizante) e com um lote de SF.

A IL-2 foi medida tal como na Experiência 3G(i). A Fig. 12A mostra que as células de NL reagiram de forma cruzada com ambos os lotes padrão. As curvas de resposta à dose de secreção de IL-2 (medidas através de ELISA tal como acima) por ambos os lotes foram semelhantes, indicando que os lotes testados partilhavam epitopos de células T semelhantes. A comparação entre AG PR e um lote de Copaxone® mostra que as células T específicas de AG PR também reagem de forma cruzada com o lote de PF, e que o manitol, o excipiente na formulação de Copaxone®, não afectou ou interferiu com a resposta das células T (Fig. 12B). Assim, este método proporciona uma indicação da reprodutibilidade lote-a-lote.

v) Discriminação entre AG e copolímeros relacionados

Na Experiência 3G(ii), foi demonstrado que o teste *in vitro* era sensível ao PM médio dos péptidos de AG, utilizando lotes de AG SF diferindo no seu PM médio. Uma vez que a experiência se baseava no bio-reconhecimento de AG por células T específicas de AG, que respondem especificamente a sequências lineares, era esperado que o método fosse sensível a variações/modificações nas sequências dos péptidos de AG. Isto foi demonstrado através da utilização de: 1) copolímeros sintetizados a partir de apenas 3 dos 4 aminoácidos que constituem AG; 2) um lote de AG (XX) resultante de modificação deliberada nas condições de fabrico, i.e., adição de um excesso de aminoácidos livres aos monómeros de AG durante a síntese. O PM médio deste lote foi elevado e fora das especificações (PM = 11150 Da); e 3) produtos de degradação de AG PR obtidos através de proteólise com tripsina e quimiotripsina.

A Tabela 10 mostra que as células T específicas de AG não responderam aos copolímeros de 3 aminoácidos sem lisina, alanina ou tirosina. Adicionalmente, a % de resposta das

células ao lote XX foi relativamente elevada e fora das especificações do método ($100 \pm 30\%$), indicando que o método poderá ser sensível a modificações no processo de produção. A elevada % de resposta pode também ser explicada através da sensibilidade do teste ao PM dos péptidos de AG, tal como demonstrado.

Tabela 10: Especificidade do Método

Copolímero	Modificação	% da Potência Média $\pm$ DPR
Tyr-Lys-Glu	Sem Alanina	0
Tyr-Ala-Glu	Sem Lisina	0
Ala-Glu-Lys	Sem Tirosina	0
Lote XX	Excesso de aminoácidos livres em estágio de polimerização	$170 \pm 4,7$

Estudos de cinética da proteólise de AG PR por tripsina e quimiotripsina mostram que o teste *in vitro* era sensível à degradação de péptidos de AG. As Figs. 13 e 15 mostram que a secreção de IL-2 pelas células era reduzida após um tempo de proteólise, e a % de potência das células para os péptidos proteolisados estava fora das especificações do método ($100 \pm 30\%$) (Tabela 11). Cromatogramas de sobreposição (através de RP-HPLC) das amostras degradadas (Figs. 14 e 16) demonstraram a cinética da proteólise por tripsina e quimiotripsina, respectivamente. Os resultados cumulativos de todos os estudos de especificidade revelaram que o método era altamente específico para AG e discriminava entre AG e antigénios intimamente relacionados.

Tabela 11: Especificidade do Método - Efeito da Proteólise

Enzima	Tempo de proteólise (minutos)	% de Potência Média
Tripsina	1	40
	5	36
	15	19
	30	7
	de um dia para o outro	0
Quimiotripsina	5	11
	20	0

Experiência 3G: Robustez

i) Robustez dos Critérios de Aceitação

A consistência e robustez dos critérios de aceitação definidos foram examinadas através de comparação das estimativas resultantes da potência relativa obtida para os lotes de AG repetidos. Os dados da análise dos lotes incluiu vários lotes de AG repetidos. Foram medidos dois lotes em três dias diferentes por operadores diferentes. Também, um lote foi testado em dois dias diferentes por operadores diferentes.

No teste de paralelismo para os lotes de AG repetidos, todos os valores do declive dos lotes de AG estavam dentro dos limites críticos apropriados para o teste da razão dos declives de paralelismo. Todos os lotes de AG satisfizeram os critérios de aceitação para as estimativas pontuais dos valores da potência relativa com limites de confiança a 95% (a % de potência estimada estava dentro dos limites de 80%-125% e os limites de confiança a 95% estavam dentro do intervalo de 70%-143%). Para os dados analisados dos lotes de AG repetidos, a sua validade não dependeu do dia da experiência nem do operador que efectuou o teste. Estes dados apoiam a robustez das especificações estabelecidas.

ii) Robustez dos Parâmetros Críticos no Procedimento de Imunização e na Reacção *in vitro*

A robustez dos parâmetros críticos em ambos os procedimentos de imunização e na reacção *in vitro* foi avaliada. Resumidamente, verificou-se que: 1) a resposta imunológica das células de NL não foi afectada pela dose de imunização de AG PR; 2) o período de imunização foi de 9-11 dias; 3) a resposta das células de NL a AG PR foi superior em comparação com a resposta das células do baço; 4) a

imunização com AG PR + CFA resultou nas células de NL terem uma resposta mais forte em comparação com a imunização com ICFA; 5) a presença de soro no meio de cultura afectou fortemente a resposta das células T específicas de AG, assim a reacção *in vitro* foi efectuada num meio sem soro; 6) o intervalo de tempo óptimo para colheita do meio de cultura foi de 18-21 horas após a incubação com AG PR e as amostras de teste; e 7) o meio de cultura pode ser mantido a -20°C até uma semana antes de ser testado em ELISA. Assim, foi mostrado que o método era robusto.

Estatística de Resumo para a Estimativa Pontual e dos Limites de Confiança a 95% da Potência Relativa

Limites de Tolerância a 95% para a Potência Relativa Média

Para avaliar os limites de aceitação para a potência relativa estimada de um novo lote, foi calculada a média e o desvio padrão de cada estimativa do log(potência):

$$\text{Média } (M_1) = 0,0074;$$

$$\text{DP } (M_1) = 0,0402.$$

Um intervalo de tolerância de aproximadamente 95% para o valor da potência relativa média, com base nos dados analisados, foi:

$$[10^{\text{Média}(M_1) \pm 2 * \text{DP}(M_1)}] * 100\% = [84\%, 122\%].$$

Intervalo dos Limites de Confiança a 95% da Potência Relativa

Os valores mínimo e máximo dos Limites de Confiança a 95% para cada estimativa da potência relativa foram:

$$\text{Mínimo (Limite Inferior)} = 79,3\%$$

$$\text{Máximo (Limite Superior)} = 147,3\%$$

Satisfação dos Critérios de Aceitação

Com base na análise, os critérios de aceitação foram determinados como sendo:

1. As suposições envolvidas na abordagem de análise de bioensaio foram verificadas, nomeadamente:
 - a. Independência e normalidade do $\log(\text{respostas})$;
 - b. Homogeneidade da variância do $\log(\text{respostas})$;
 - c. Ausência de valores extremos; e
 - d. Paralelismo (não significância do teste da razão dos declives).
2. A potência relativa estimada não foi inferior a 80% e não foi mais de 125% da potência padrão; e
3. Os Limites de Confiança a 95% do erro da potência relativa estimada não foram inferiores a 70% e não foram mais de 143% da potência padrão.

Discussão do Exemplo 3

A validação do teste *in vitro* revelou que o método era reprodutível e a exactidão e precisão médias estavam num intervalo aceitável. O método foi altamente específico para péptidos de AG e sensível à qualidade da substância activa.

SUMÁRIO E DISCUSSÃO

Foi desenvolvido um método *in vitro* para lotes de AG SF e Copaxone®. Este método baseou-se no bio-reconhecimento de epitopos de células T (sequência lineares) por células T específicas de AG PR. As células T específicas de AG PR segregam citocinas Th_0 em resposta a AG em cultura. Neste método, o reconhecimento dos lotes de AG por células T é monitorizado através da medição dos níveis de IL-2 no meio de cultura através de ELISA. Foi mostrado que as células T específicas de AG PR são reactivas de forma cruzada com lotes de SF e PF, indicando que estes lotes partilham sequências semelhantes com o lote de PR, e que o manitol, o

excipiente na formulação de PF, não interfere com a reacção.

O método foi muito específico para péptidos de AG e é sensível para o PM médio da mistura de péptidos. A MBP não foi reconhecida pelas células T específicas de AG. Péptidos imunodominantes de MBP (péptidos tanto encefalitogénicos como supressores), bem como péptidos simples com uma composição de aminoácidos semelhante à do AG, não estimularam as células T. Os parâmetros críticos no procedimento de imunização, bem como a reacção *in vitro*, foram optimizados durante esta experiência. Esta experiência mostrou que o método era muito reproduzível e robusto.

O método pode ser adaptado para padronizar outros antígenos de células T para utilização em composições farmacêuticas. Pode ser feita uma cultura primária de células T específicas para um antígeno PR, em vez de AG PR, a partir de animais imunizados contra o antígeno PR. Pode ser medida a produção de citocinas desta cultura em resposta a um antígeno PR e em resposta ao antígeno da amostra. A produção de citocinas em resposta a um antígeno PR pode ser representada num gráfico contra a concentração do antígeno PR para criar uma curva padrão. A produção de citocinas em resposta ao antígeno da amostra pode ser comparada com a curva padrão para determinar se o antígeno está dentro do intervalo de potência aceitável.

A citocina óptima para monitorizar pode ser determinada tal como na Experiência 2A. As condições para imunização e teste *in vitro* podem ser optimizados tal como nas Experiências 2B e C.

Referências

Patente U.S. N°. 3,849,550, publicada a 19 de Novembro de 1974 (Teitelbaum, *et al.*).

Patente U.S. N°. 5,800,808, publicada a 1 de Setembro de 1998 (Konfino, *et al.*).

Publicação Internacional PCT N°. WO 00/05250, publicada a 3 de Fevereiro de 2000 (Aharoni *et al.*).

Publicação Internacional PCT N°. WO 00/18794

Aharoni, R. *et al.*, "T suppressor hybridomas and interleukin-2-dependent lines induced by copolymer 1 or by spinal cord homogenate down-regulate experimental allergic encephalomyelitis", *Eur. J. Immunol.* 23: 17-25 (1993).

Bornstein, *et al.*, *New Eng. J. Med.* 317(7): 408-414 (1987).

Johnson, K.P., *Neurology* 1: 65-70 (1995).

Lando *et al.*, "Effect of cyclophosphamide on suppressor cell activity in mice unresponsive to EAE", *J. Immunol.* 123(5): 2156-2160 (1979).

Lisak *et al.*, "In vitro and in vivo immune responses to homologous myelin basic protein in EAE", *Cell. Immunol.* 11: 212-220 (1974).

"Copaxone" em *Physician's Desk Reference*, 2000, Medical Economics Co., Inc., Montvale, NJ, 3115.

"Validation of Analytical Procedures: Methodology", Nov. 1996 (CPMP/ICH/281/95).

European Pharmacopoeia, 1997.

Lisboa, 30 de Setembro de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para medição da potência de um lote de teste de acetato de glatirâmero relativamente à potência conhecida de um lote de referência que compreende:

- a) imunização de ratinhos fêmeas (SJL x BALB/C)F1 entre 8 e 12 semanas de idade com uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de referência.
- b) preparação de uma cultura primária de células de nódulos linfáticos dos ratinhos do passo (a) 9-11 dias após a imunização;
- c) incubação separadamente de pelo menos cinco amostras de referência, cada uma das quais contém um número predeterminado de células da cultura primária do passo (b) e uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero entre 1 µg/mL e 25 µg/mL de um lote de referência;
- d) incubação de pelo menos duas amostras, cada uma das quais contém um número predeterminado de células da cultura primária do passo (b) e uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de teste;
- e) determinação para cada amostra nos passos (c) e (d), da quantidade de interleucina-2 segregada pelas células em cada amostra após 18-21 horas de incubação de tal amostra;
- f) correlação das quantidades de interleucina-2 segregada pelas amostras incubadas com o lote de teste de acetato de glatirâmero com as quantidades de interleucina-2 segregada pelas amostras incubadas com o lote de referência de acetato de glatirâmero de modo a determinar a potência do lote de teste de acetato de glatirâmero relativamente ao lote de referência de acetato de glatirâmero,

em que em cada amostra nos passos (c) e (d), o número de células predeterminado é substancialmente idêntico, e em que para cada amostra contendo uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de teste existe uma amostra de referência correspondente contendo uma quantidade predeterminada substancialmente idêntica de acetato de glatirâmero do lote de referência.

2. Processo da reivindicação 1, em que seis amostras de referência são separadamente incubadas no passo (d).

3. Processo para medição da potência de um lote de teste de acetato de glatirâmero relativamente à potência conhecida de um lote de referência que compreende:

- a) imunização de um mamífero de teste com uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de referência;
- b) preparação de uma cultura primária de células do mamífero de teste do passo (a) num momento predeterminado após a imunização;
- c) incubação separadamente de pelo menos duas amostras de referência, cada uma das quais contém um número predeterminado de células da cultura primária do passo (b) e uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero de um lote de referência;
- d) incubação de pelo menos duas amostras, cada uma das quais contém um número predeterminado de células da cultura primária do passo (b) e uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de teste;
- e) determinação para cada amostra nos passos (c) e (d), da quantidade de uma citocina segregada pelas células em cada amostra após um período de tempo predeterminado de incubação de tal amostra;

f) correlação das quantidades da citocina segregada pelas amostras incubadas com o lote de teste de acetato de glatirâmero com as quantidades da citocina segregada pelas amostras incubadas com o lote de referência de acetato de glatirâmero de modo a determinar a potência do lote de teste de acetato de glatirâmero relativamente ao lote de referência de acetato de glatirâmero.

em que em cada amostra nos passos (c) e (d), o número de células predeterminado é substancialmente idêntico, e em que para cada amostra de imunização contendo uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero do lote de teste existe uma amostra de referência correspondente contendo uma quantidade predeterminada substancialmente idêntica de acetato de glatirâmero do lote de referência.

4. Processo da reivindicação 3, em que a citocina é uma interleucina.

5. Processo da reivindicação 4, em que a interleucina é interleucina-2.

6. Processo da reivindicação 4, em que a interleucina é interleucina-6.

7. Processo da reivindicação 4, em que a interleucina é interleucina-10.

8. Processo da reivindicação 3, em que a citocina é interferão-gama.

9. Processo da reivindicação 3, em que o mamífero produz células T específicas para acetato de glatirâmero padrão de referência.

10. Processo da reivindicação 3, em que o mamífero é um roedor.

11. Processo da reivindicação 10, em que o roedor é um ratinho.

12. Processo da reivindicação 11, em que o ratinho é um ratinho fêmea (SJL x BALB/C)F1.

13. Processo da reivindicação 3, em que o mamífero tem cerca de 8 a cerca de 12 semanas de idade.

14. Processo da reivindicação 3, em que as células são células de nódulos linfáticos.

15. Processo da reivindicação 3, em que as células são células do baço.

16. Processo para preparação de um lote de acetato de glatirâmero aceitável para utilização farmacêutica que compreende:

- a) preparação de um lote de acetato de glatirâmero;
- b) medição da potência relativa do lote de acordo com o processo da reivindicação 1; e
- c) qualificação do lote como aceitável para utilização farmacêutica se a potência relativa assim medida estiver entre 80% e 125% do lote de referência de acetato de glatirâmero.

17. Processo para preparação de acetato de glatirâmero aceitável para utilização farmacêutica que compreende:

- a) preparação de um lote de acetato de glatirâmero;
- b) medição da potência relativa do lote de acordo com o processo de qualquer uma das reivindicações 3 a 15;
- e

c) qualificação do lote como aceitável para utilização farmacêutica se a potência relativa assim medida estiver entre 80% e 125% do lote de referência de acetato de glatirâmero.

18. Processo para preparação de uma composição farmacêutica contendo acetato de glatirâmero que compreende:

- obtenção de um lote de acetato de glatirâmero a testar;
- medição, separadamente, da quantidade de interleucina-2 segregada por uma cultura primária de células T obtidas de ratinhos fêmeas (SJL x BALB/C)F1 imunizados com uma quantidade definida de um lote de padrão de referência de acetato de glatirâmero,
 - a) onde uma amostra contendo um número predeterminado de tais células é incubada na presença de uma quantidade predeterminada do lote de padrão de referência, e
 - b) onde uma amostra contendo o número predeterminado de células substancialmente idêntico é incubada na presença da mesma quantidade predeterminada do lote de acetato de glatirâmero a testar;
 - comparação das quantidades de interleucina-2 segregadas que são assim medidas para determinar a potência de um lote de acetato de glatirâmero a testar; e
- inclusão da composição farmacêutica num lote apenas se a sua potência assim medida estiver entre 80% e 125% do lote de padrão de referência.

19. Processo para determinação da potência de um lote de acetato de glatirâmero que compreende:

- medição, separadamente, da quantidade de interleucina-2 segregada por uma cultura primária de células T obtida de ratinhos fêmea (SJL x BALB/C)F1 imunizados

com uma quantidade definida de um lote de padrão de referência de acetato de glatirâmero,

a) onde uma amostra contendo um número predeterminado de tais células é incubada na presença de uma quantidade predeterminada do lote de padrão de referência; e

b) onde uma amostra contendo o número de células predeterminado substancialmente idêntico é incubada na presença da mesma quantidade predeterminada do lote de acetato de glatirâmero a testar;

- comparação das quantidades de interleucina-2 segregadas que são assim medidas, determinado deste modo a potência do lote.

20. Processo para determinação de se um lote de acetato de glatirâmero tem uma potência predeterminada aceitável para inclusão numa composição farmacêutica que compreende:

- medição, separadamente, da quantidade de interleucina-2 segregada por uma cultura primária de células T obtidas de ratinhos fêmeas (SJL x BALB/C)F1 imunizados com uma quantidade definida de um lote de padrão de referência de acetato de glatirâmero,

a) onde uma amostra contendo um número predeterminado de tais células é incubada na presença de uma quantidade predeterminada do lote de padrão de referência, e

b) onde uma amostra contendo o número de células predeterminado substancialmente idêntico é incubada na presença da mesma quantidade predeterminada do lote de acetato de glatirâmero a testar;

- comparação das quantidades de interleucina-2 segregadas que são assim medidas para determinar a potência do lote; e

- comparação da potência assim medida com uma potência predeterminada para determinar se o lote é aceitável para inclusão na composição farmacêutica.

21. Processo de qualquer uma das reivindicações 1 ou 3 a 20, em que o lote de padrão de referência é um lote de acetato de glatirâmero possuindo um peso molecular médio de 7000 Da.

22. Processo para preparação de uma composição farmacêutica contendo acetato de glatirâmero compreendendo a obtenção de um lote de acetato de glatirâmero; e medição da potência do lote de acetato de glatirâmero relativamente à potência de um padrão de referência de acetato de glatirâmero através de:

- a) preparação de uma cultura primária de células T de ratinhos fêmeas (SJL x BALB/C)F1 entre 8 e 12 semanas de idade imunizados com uma quantidade predeterminada do padrão de referência;
- b) incubação, separadamente, de amostras de referência, cada uma das quais contendo um número predeterminado de células da cultura primária do passo (a) e uma quantidade predeterminada do padrão de referência entre 1 µg/mL e 25 µg/mL;
- c) incubação de pelo menos duas amostras, cada uma das quais contendo um número predeterminado de células da cultura primária do passo (a) e uma quantidade predeterminada do lote de acetato de glatirâmero;
- d) determinação para cada amostra nos passos (b) e (c), da quantidade de interleucina-2 segregada pelas células T em cada amostra após 18-21 horas de incubação de tal amostra; e
- e) correlação das quantidades de interleucina-2 segregadas pelas amostras incubadas com o lote de acetato de glatirâmero com as quantidades de

interleucina-2 segregadas pelas amostras incubadas com o padrão de referência de modo a determinar a potência do lote de acetato de glatirâmero relativamente ao padrão de referência,

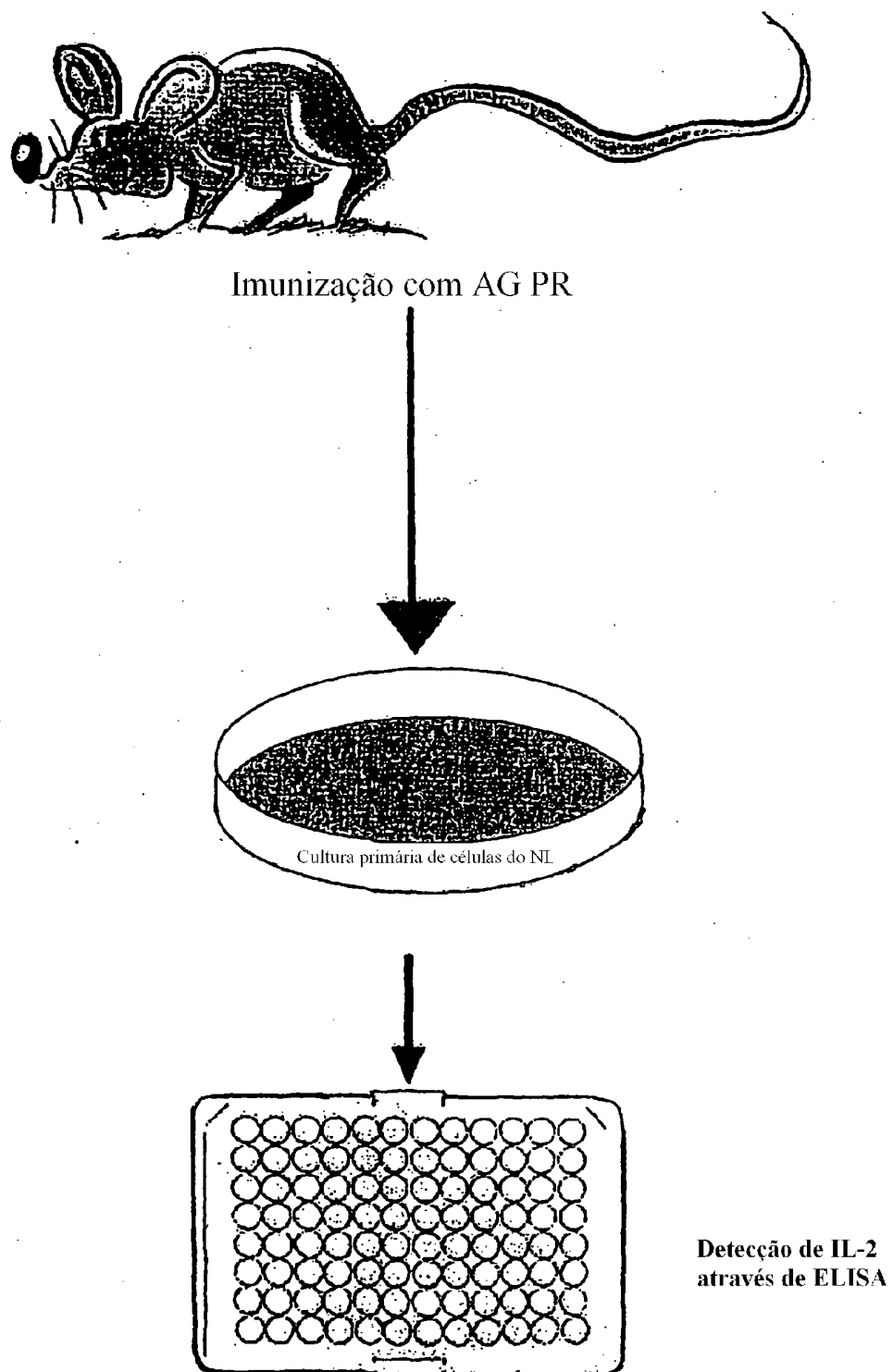
em que em cada amostra nos passos (b) e (c), o número de células predeterminado é substancialmente idêntico, e em que para cada amostra contendo uma quantidade predeterminada de acetato de glatirâmero existe uma amostra de referência correspondente contendo uma quantidade predeterminada substancialmente idêntica do padrão de referência; e preparação da composição farmacêutica utilizando o lote de acetato de glatirâmero se a sua potência relativa assim medida estiver entre 80% e 125% da potência do padrão de referência.

23. Processo de qualquer uma das reivindicações 18 a 22, em que as células são células de nódulos linfáticos.

24. Processo de qualquer uma das reivindicações 18 a 22, em que as células são células do baço.

Lisboa, 30 de Setembro de 2010

FIGURA 1



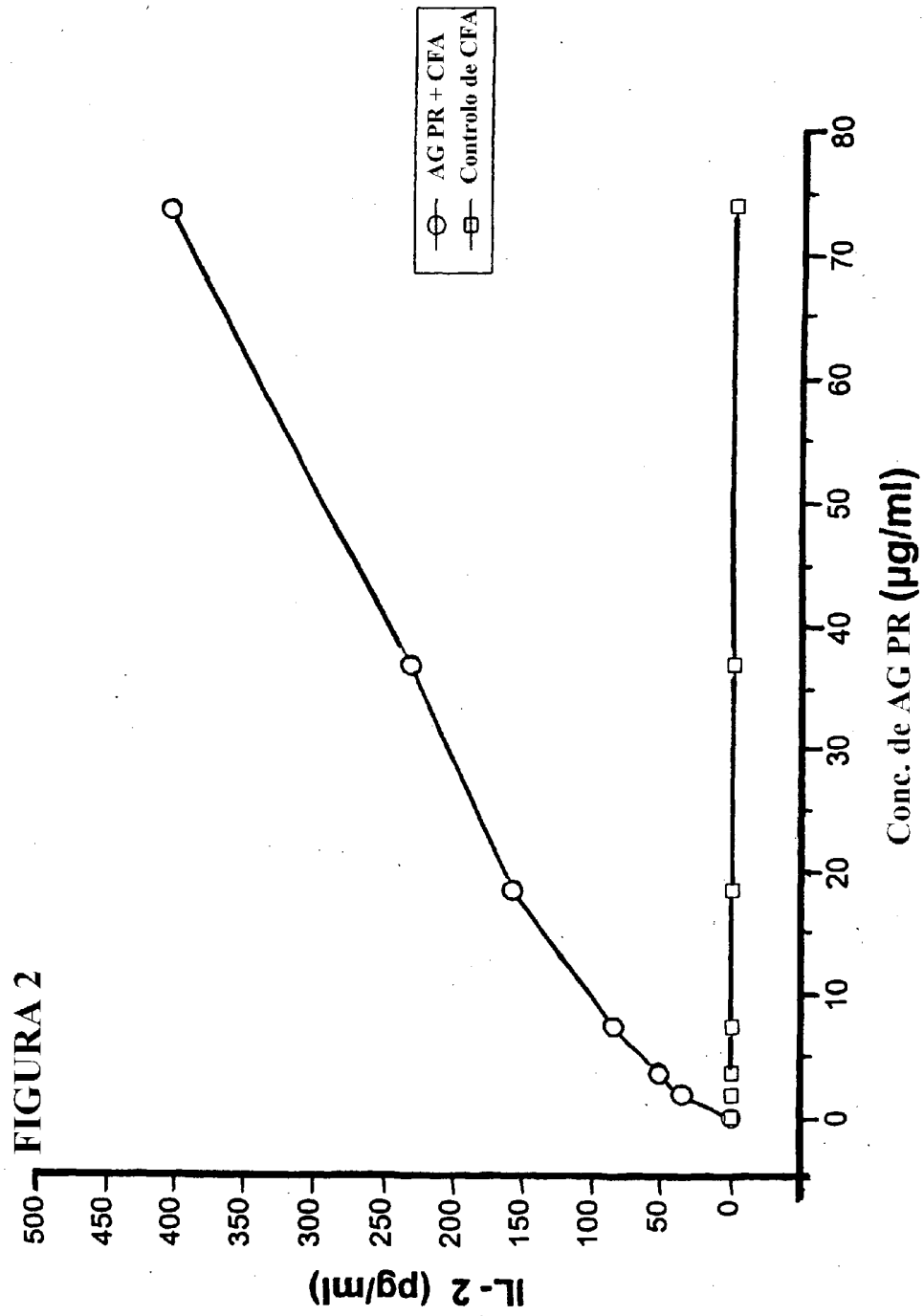


FIGURA 3

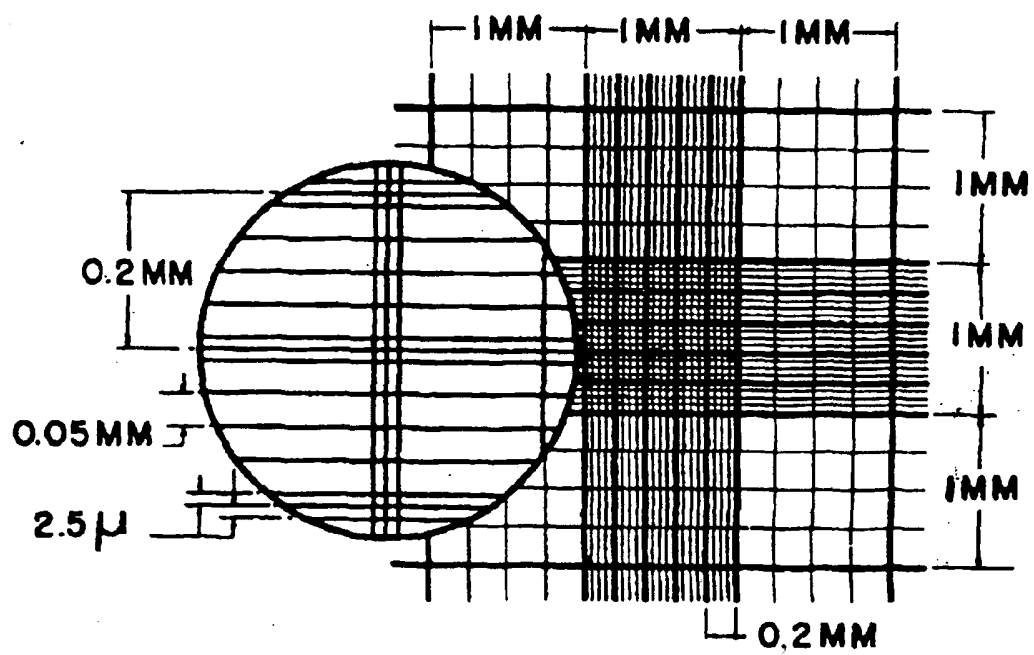


FIGURA 4

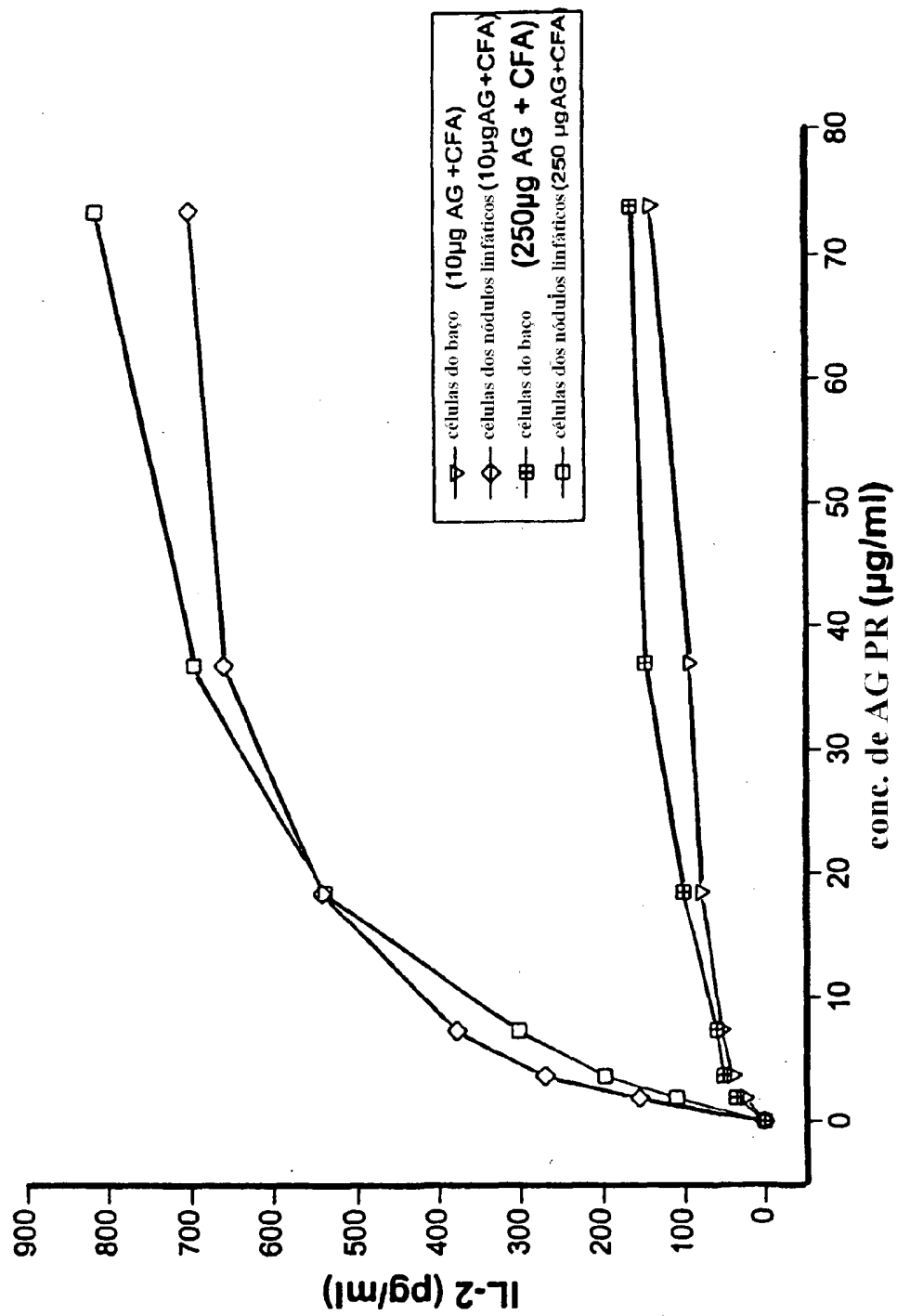


FIGURA 5

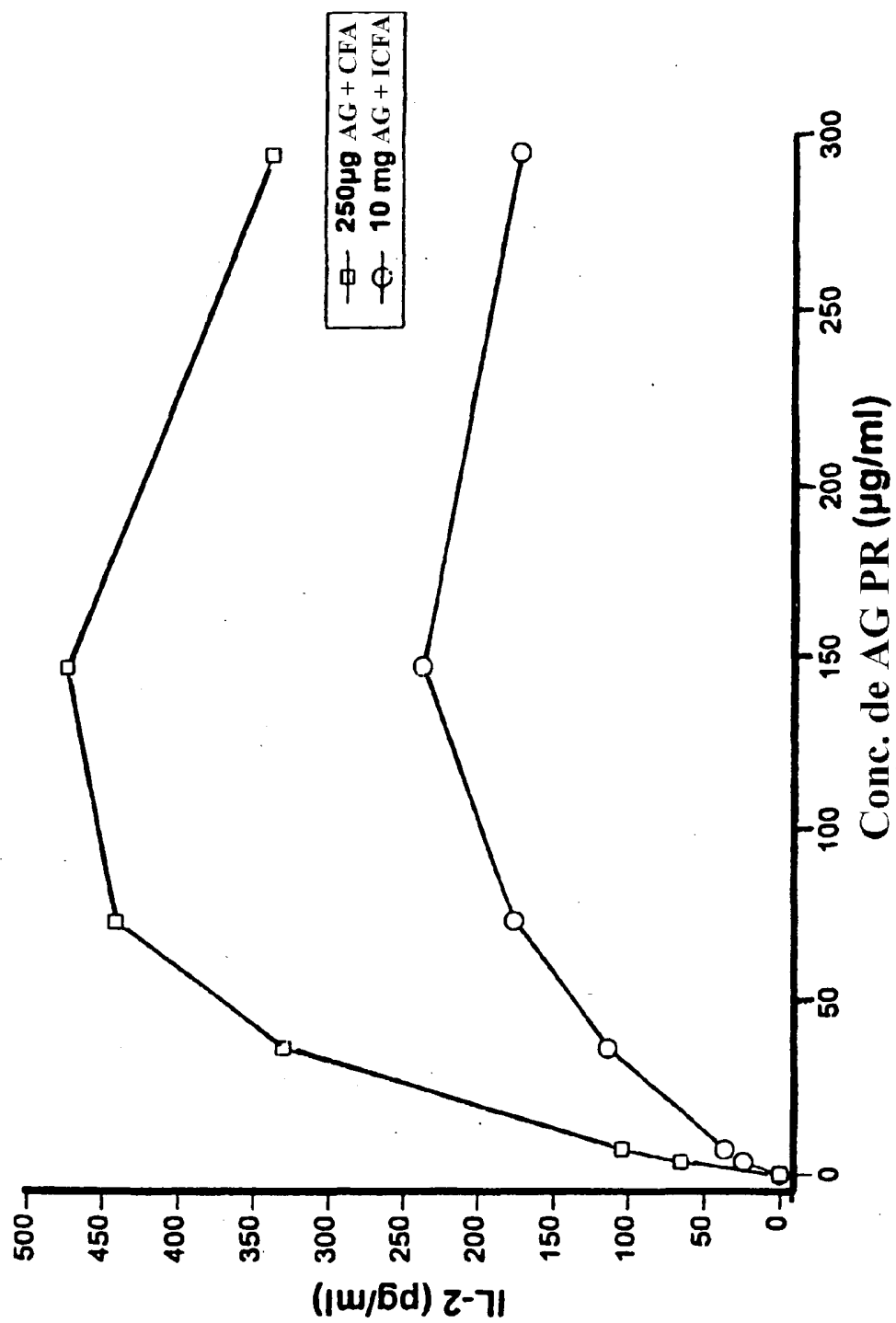
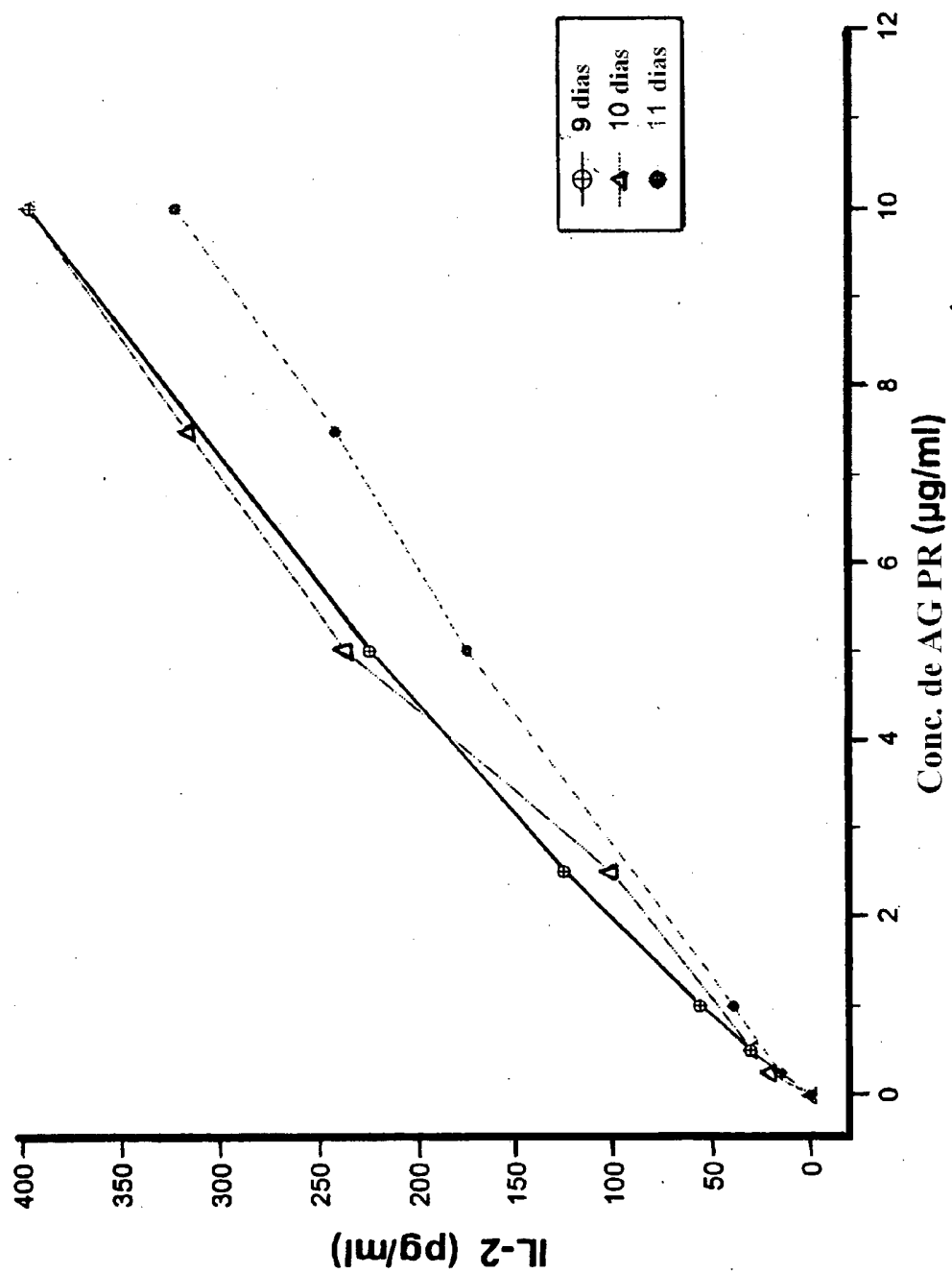
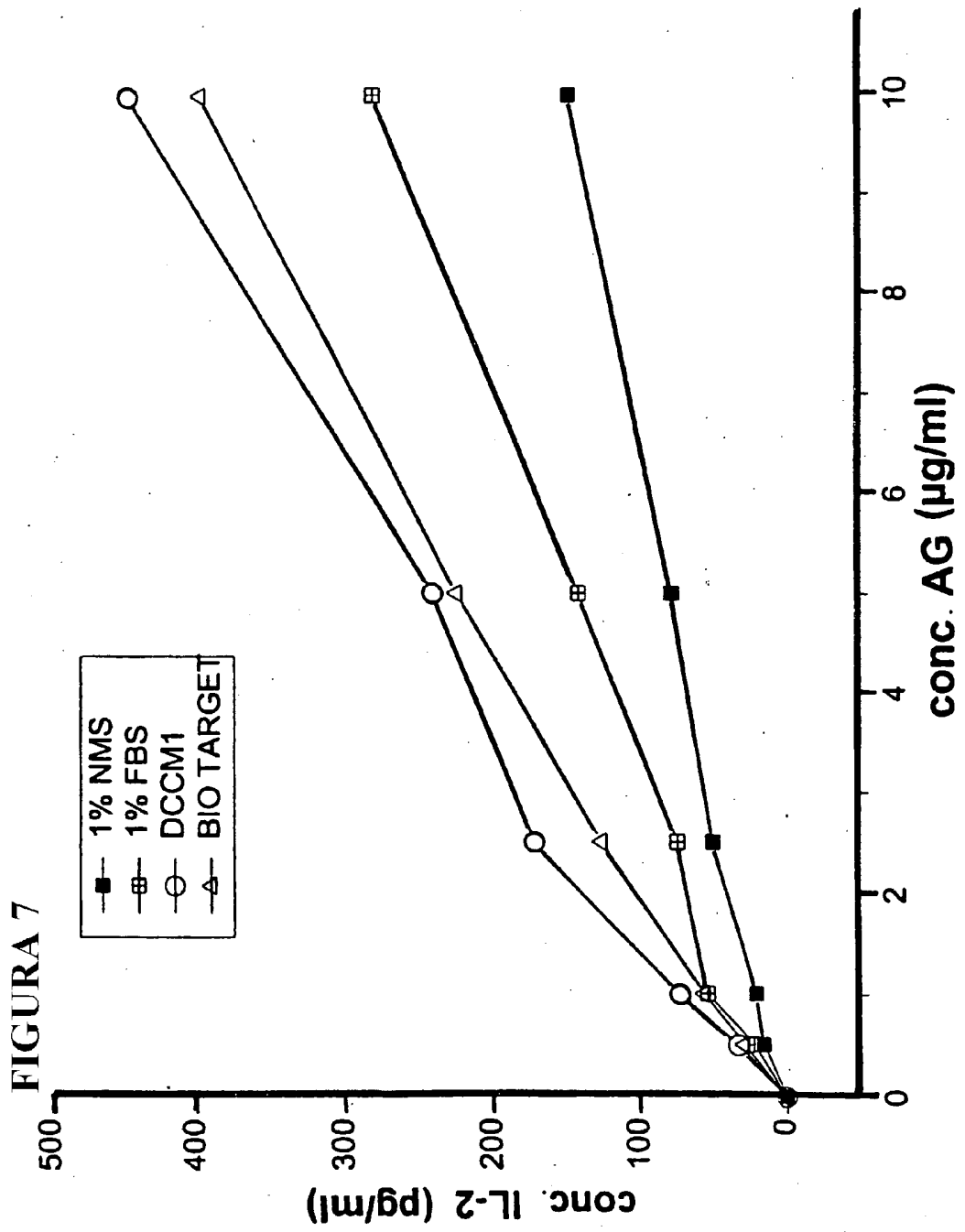


FIGURA 6





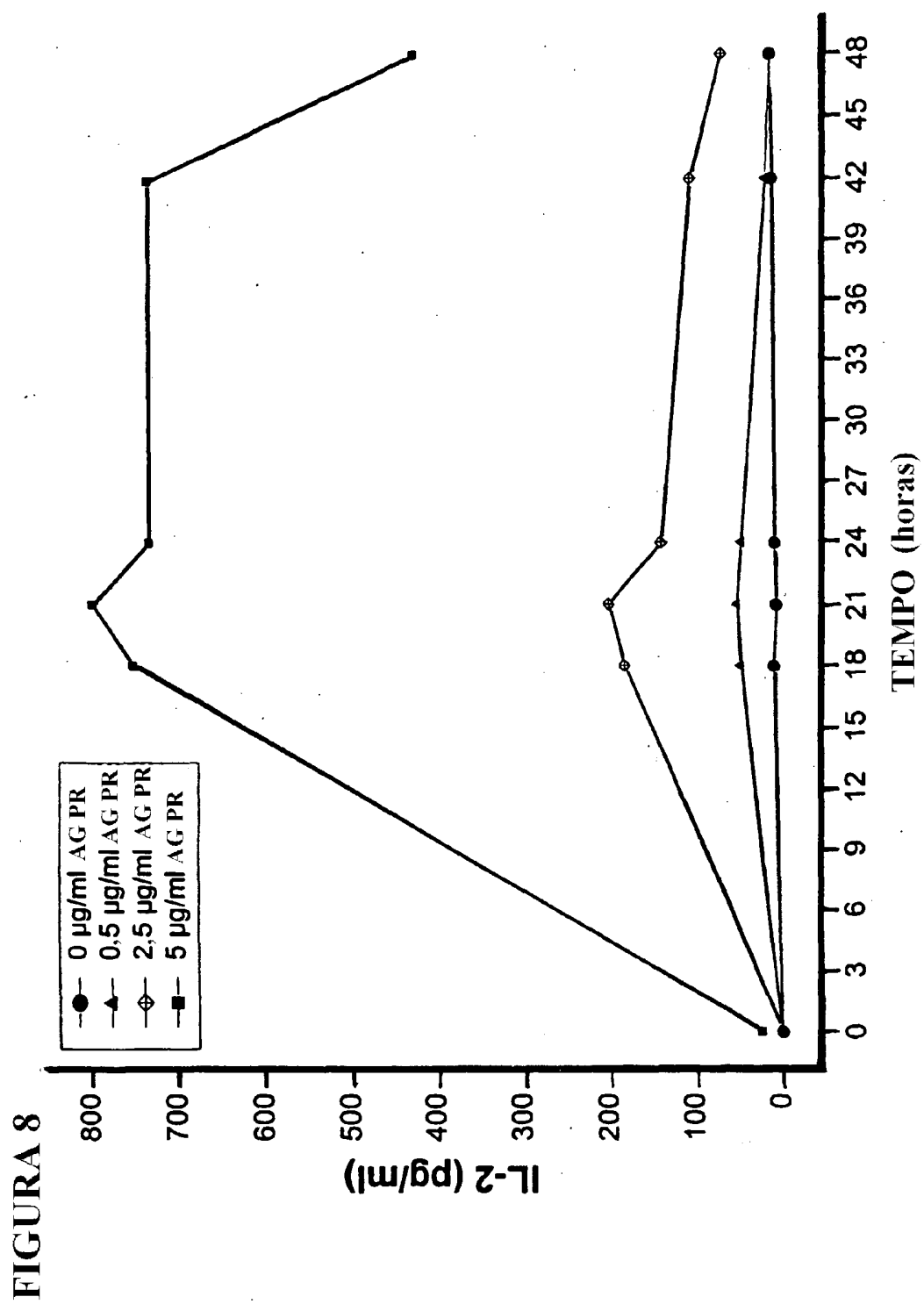


FIGURA 9

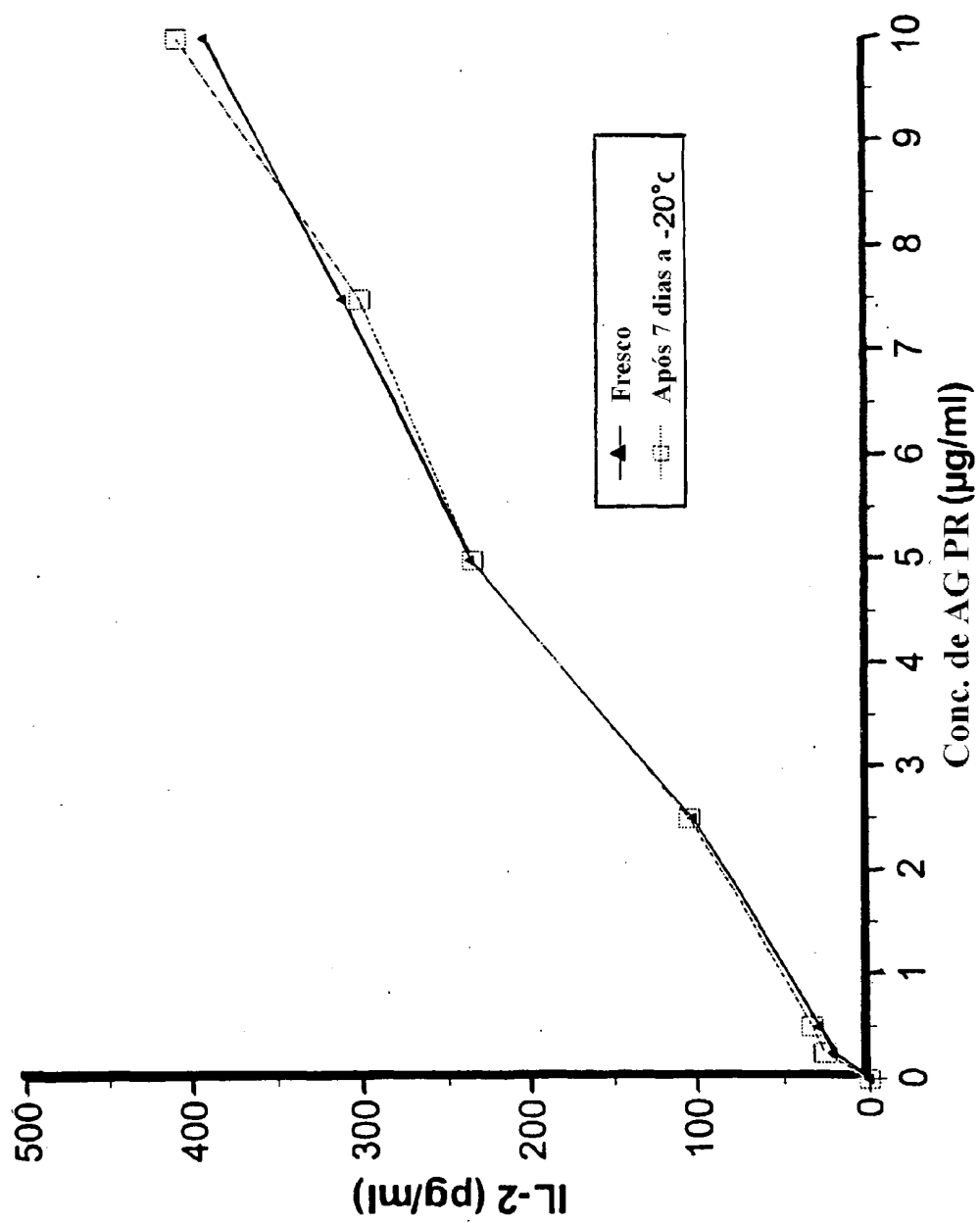


FIGURA 10

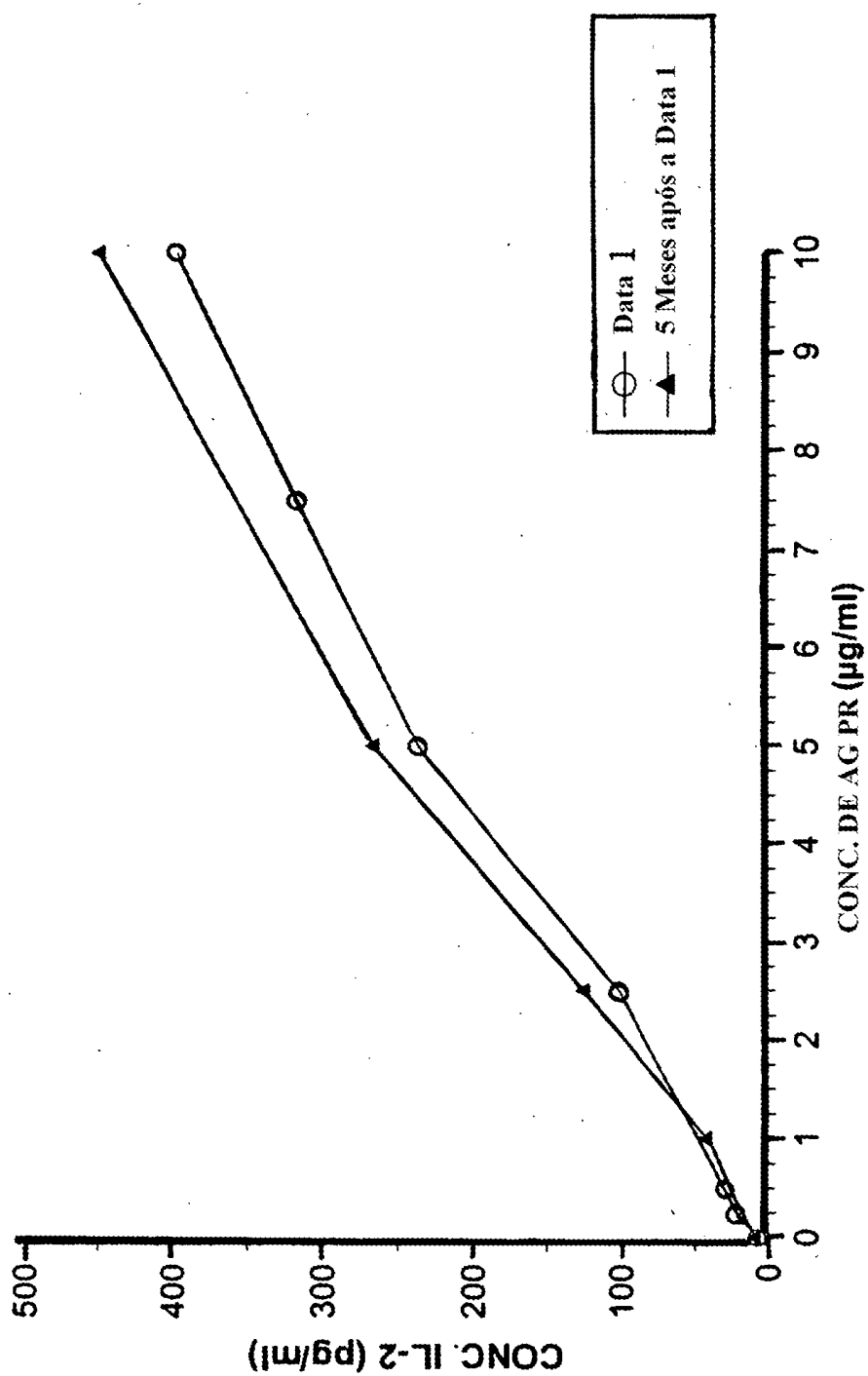


FIGURA 11

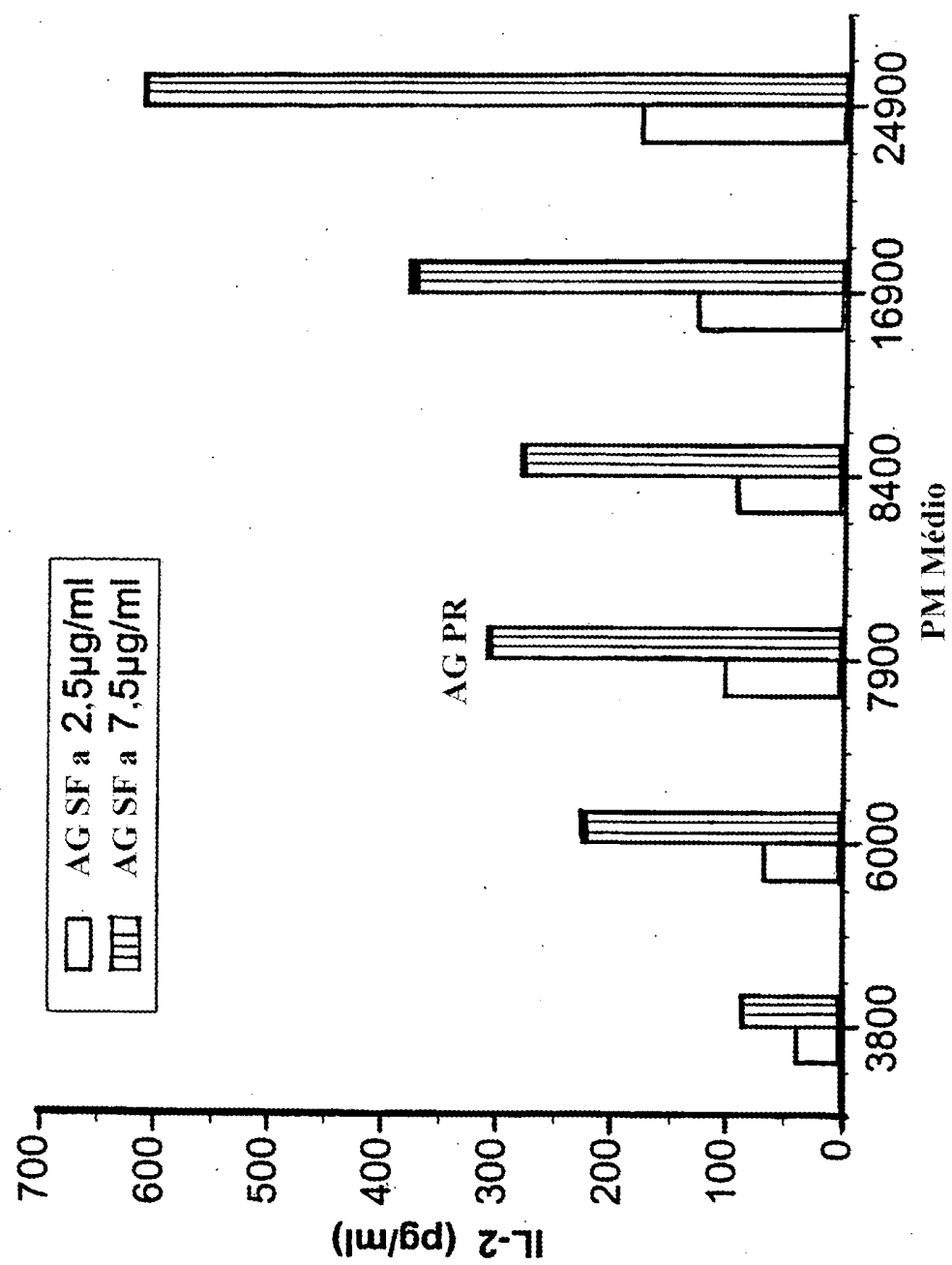
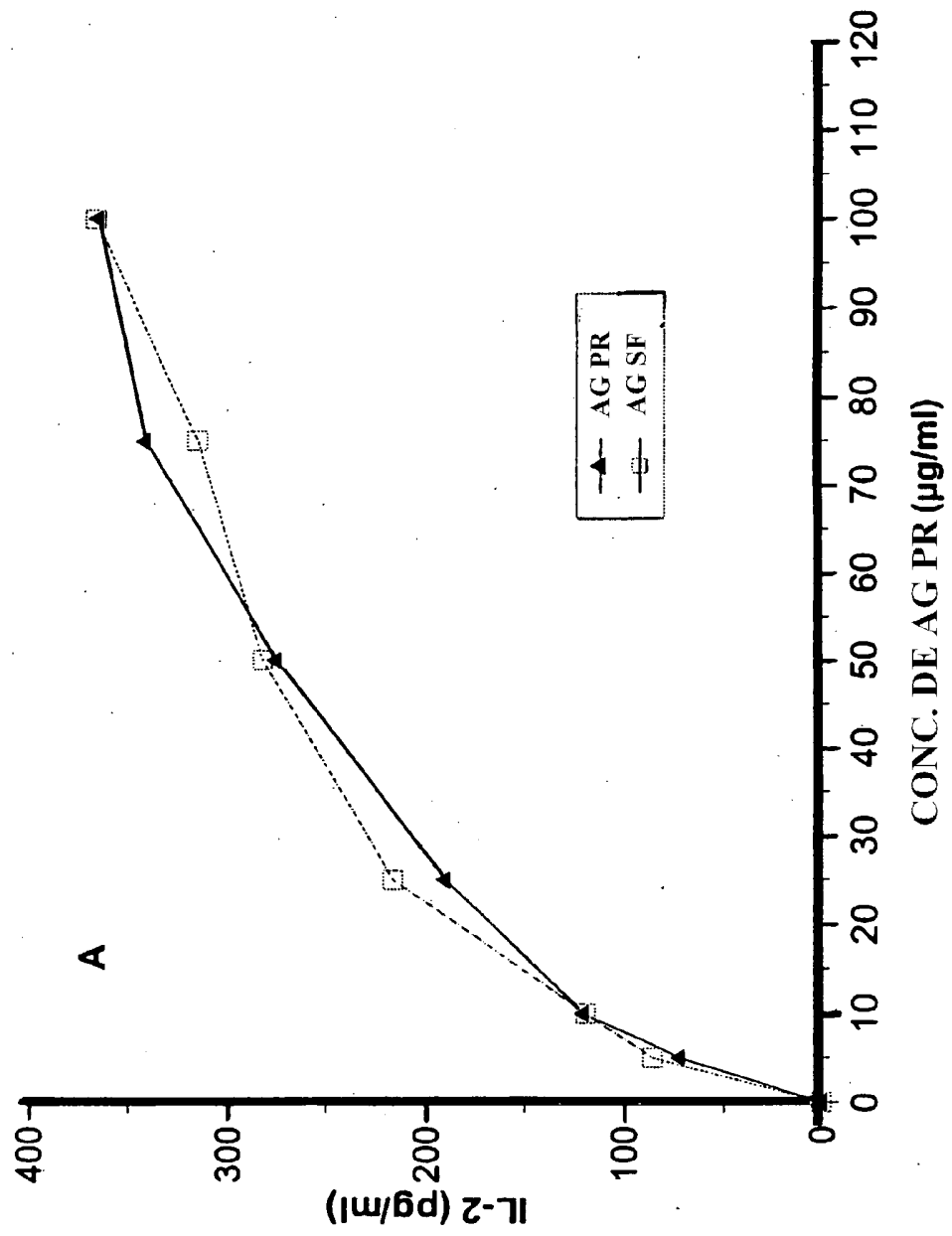


FIGURA 12A



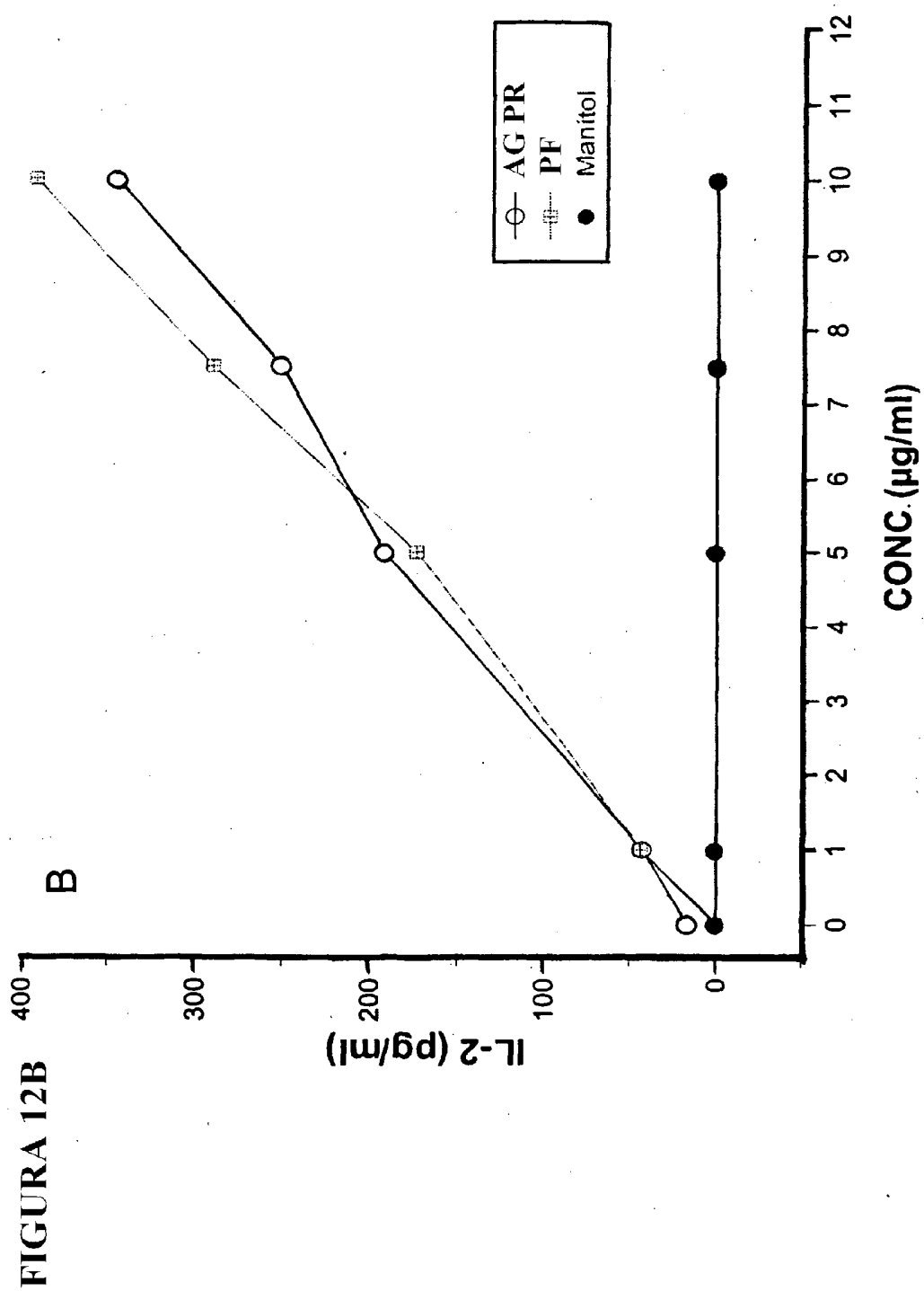
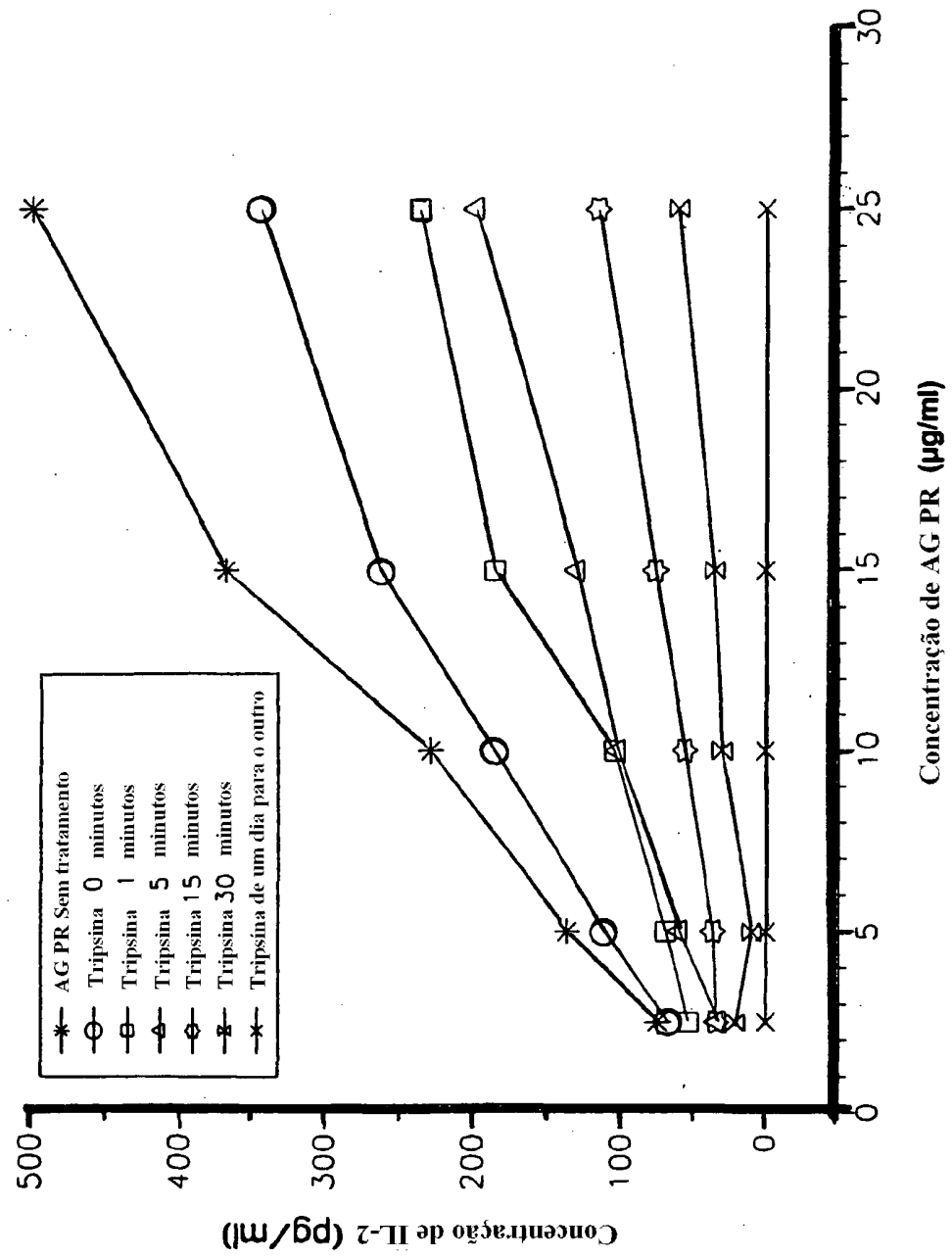
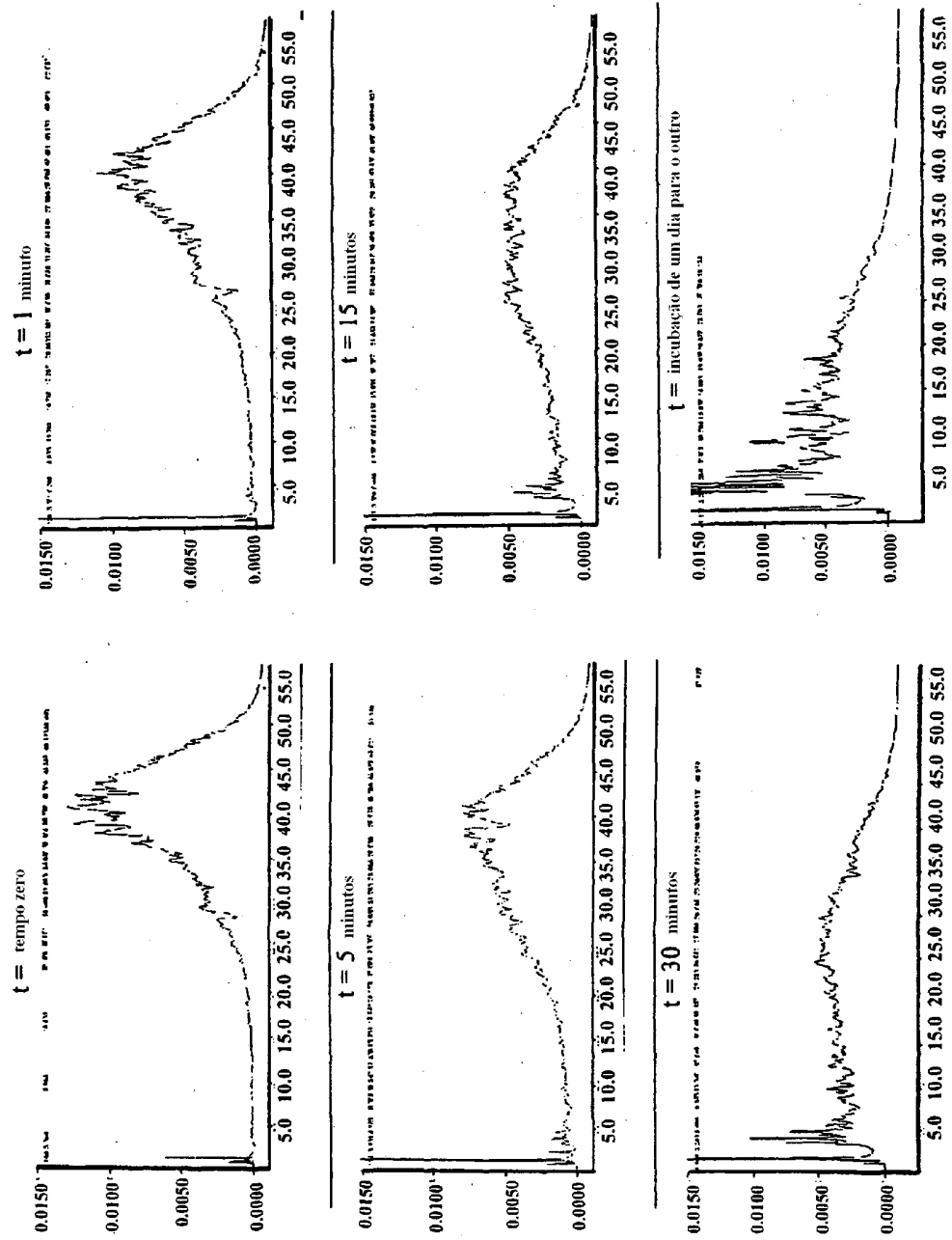


FIGURA 13





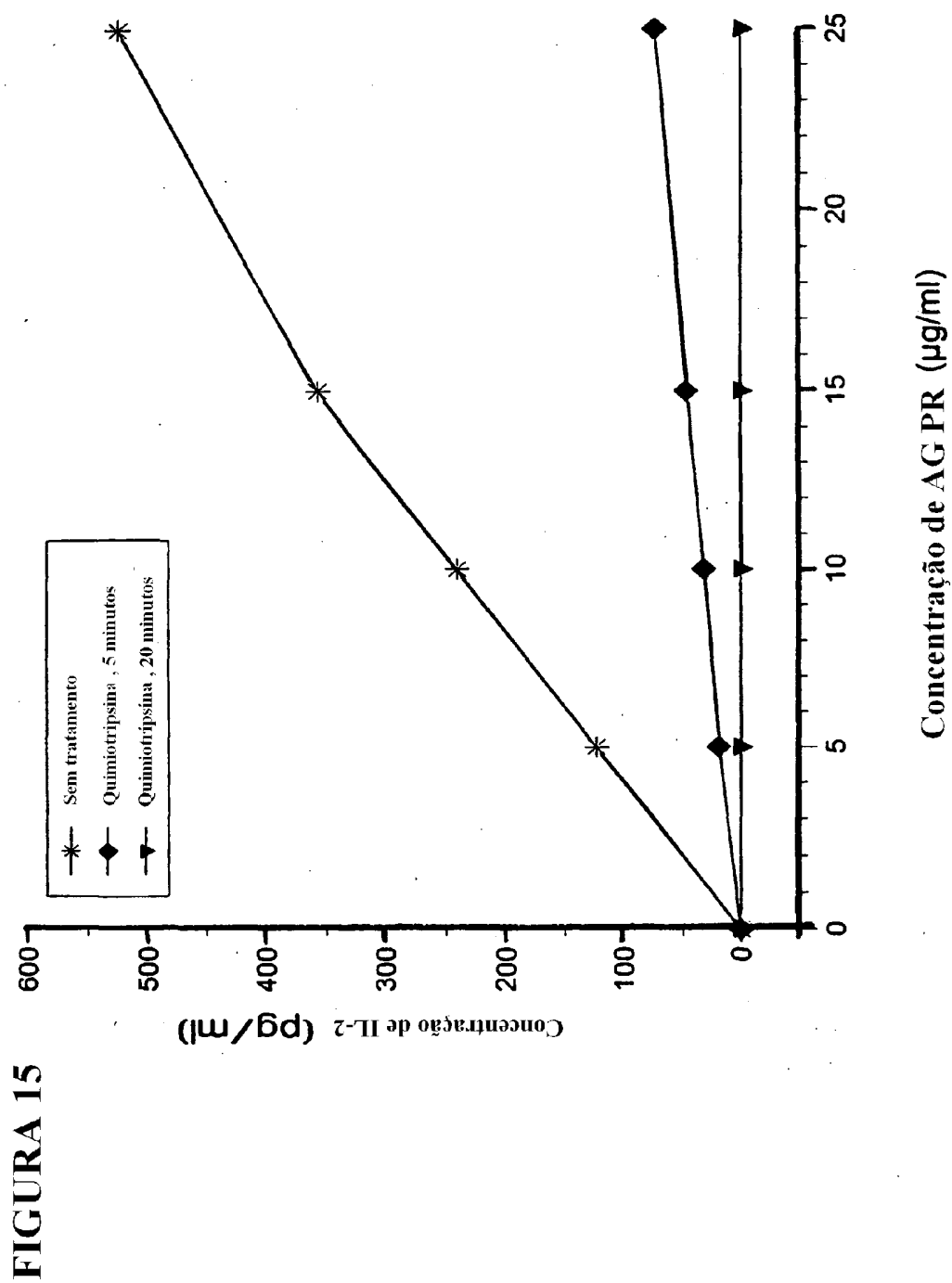


FIGURA 16