

Estañ-Cerezo G. §, Mancheño-Maciá E. \*, Conesa-García V. †, Antón-Torres R. †, García-Monsalve A. †, Navarro-Ruiz A. †, Escudero-Ortiz V. \*

\* Grupo de Investigación en Farmacia y Nutrición Clínica, Universidad CEU Cardenal Herrera. § HGUE-FISABIO. † Servicio de Hematología HGUE. † Servicio de Farmacia HGUE.

## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Nilotinib es un inhibidor selectivo de la proteína tirosina kinasa, utilizado en el tratamiento de leucemia mieloide crónica (LMC) en fase crónica y fase acelerada. La mayoría de pacientes resistentes a Imatinib son sensibles a Nilotinib, ya que éste se une más estrechamente a la Bcr-Abl.

La monitorización terapéutica del nilotinib aporta numerosas ventajas ya que este fármaco muestra una alta variabilidad farmacocinética interindividual, lo que puede conducir a una variación en su efecto anticancerígeno y/o toxicidad [1].

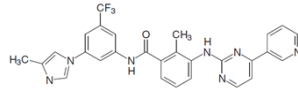


Figura 1. Estructura química de nilotinib

El objetivo del presente estudio ha sido validar un método analítico para la cuantificación de nilotinib en muestras plasmáticas de pacientes oncohematológicos mediante HPLC-UV y valorar su aplicabilidad en la práctica clínica.

## METODOLOGÍA

### Preparación de patrones de calibración y controles

Las soluciones madre de nilotinib (5 mg/mL) y rilpivirina (2 mg/mL) se han preparado en DMSO y se han almacenado a -80°C en oscuridad. Los patrones de calibración en plasma se prepararon cada día de estudio en un rango de concentración de nilotinib de 125 a 7000 ng/ml. Los controles de calidad (QCs) de nilotinib han sido controles de 250, 900 y 5000 ng/ml.

### Preparación de las muestras plasmáticas

La extracción de nilotinib y rilpivirina (patrón interno (PI)) de las muestras de plasma se ha realizado mediante extracción por precipitación de proteínas con acetonitrilo.

### Condiciones cromatográficas

- Fase Estacionaria: Columna Cromatográfica C<sub>18</sub>Tracer Excel 120 ODS (5 µm; 15 mmx0.46 mm)
- Fase Móvil: Dihydrogenofosfato potásico 0.037M (pH 5.55) / Acetonitrilo/ Metanol (45%, 45%, 10%, v/v/v).
- Elusión, realizada a temperatura ambiente, flujo 1.7 ml/min.
- Detección ultravioleta 254 nm para nilotinib y rilpivirina.

### Validación del método analítico

Siguiendo las Guías de las Agencias Regulatoras (FDA [2] y EMA [3,4]), el protocolo de validación ha incluido la realización de ensayos de linealidad, exactitud, precisión intra- e interdía, límite de cuantificación, selectividad y recuperación. Para la determinación de linealidad, exactitud y precisión se han realizado los ensayos 3 días diferentes.

## RESULTADOS

Se han obtenido perfiles cromatográficos con adecuada resolución y simetría (Figura 2). El tiempo total de análisis por muestra ha sido de 10 minutos y los tiempos de retención de PI y nilotinib han sido de 6.8 y 8.8 minutos, respectivamente.

## CONCLUSIONES

- ✓ El método desarrollado mediante HPLC-UV para la cuantificación de nilotinib en plasma humano es rápido, simple y preciso, y cumple con los estándares de calidad descritos por la Agencias Regulatoras.
- ✓ El método analítico puede ser empleado en la práctica clínica rutinaria para la monitorización terapéutica de nilotinib

1- Bo Gao et al. Journal of Clinical Oncology 2012;32:4017-25  
2- FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. May 2001.  
3- EMA. Guideline on Validation of Analytical procedures: Definition and Terminology. 1998.  
4- EMA. Guideline on Validation of Analytical procedures: Methodology. 1998.

## RESULTADOS

### Cromatogramas y validación

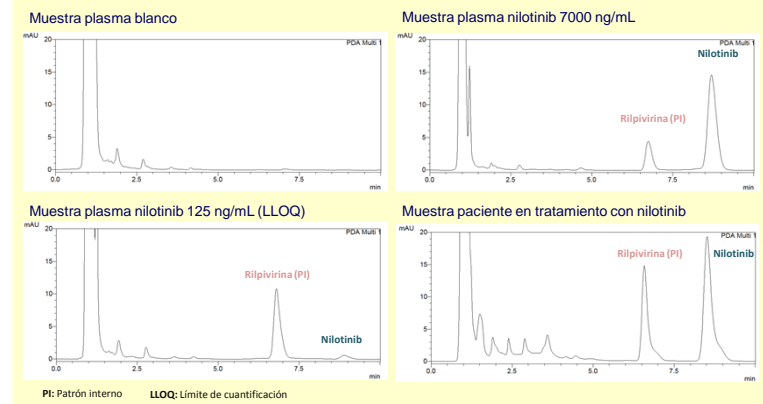


Figura 2. Cromatogramas método analítico para la cuantificación de nilotinib

### Linealidad

El coeficiente de correlación (r) ha sido superior a 0.999 en las 3 rectas de calibración (125 a 7000 ng/ml).

### Selectividad

Se ha desarrollado un método selectivo, no se han evidenciado interferencias entre los componentes endógenos del plasma humano al tiempo de retención de nilotinib o rilpivirina (Figura 2).

### Recuperación

La recuperación para nilotinib en los niveles de concentración 250, 900 y 5000 ng/ml fue de 81.0% (± 14.7), 74.0% (± 4.9) y 65.1% (± 21.4), respectivamente. Para rilpivirina ha sido de 67.0% (± 21.4).

### Precisión, exactitud y límite de cuantificación (LLOQ)

Los valores obtenidos de precisión y exactitud intra e interdía para los QCs (<15%) y el LLOQ (<20%) muestran que el método es exacto y reproducible (Tabla 1).

Tabla 1. Exactitud y precisión de la cuantificación de nilotinib en plasma humano

Concentración nilotinib (ng/mL)	INTRADÍA			INTERDÍA		
	C.observada (DE±) (ng/mL)	Exactitud (ERM,%)	Precisión (CV,%)	C.observada (DE±) (ng/mL)	Exactitud (ERM,%)	Precisión (CV,%)
125	120.3 (4.1)	3.7	3.4	121.6 (3.2)	2.7	2.6
250	245.6 (11.1)	10.2	4.0	267.5 (10.5)	7	3.9
900	866.9 (12.3)	3.7	2.1	883.3 (18.4)	1.8	2.1
5000	4705.8 (96.7)	5.9	2	4791.4 (147.6)	4.2	3.1

C.: concentración; DE: desviación estándar; ERM: error relativo medio; CV: coeficiente de variación

### Aplicación del método en pacientes con LMC

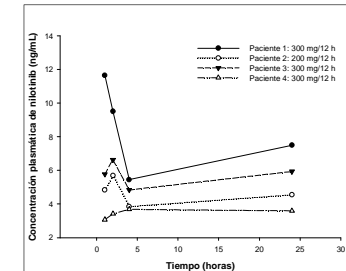


Figura 3. Perfiles de concentración vs tiempo de pacientes en tratamiento con nilotinib

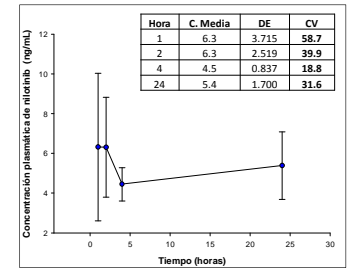


Figura 4. Perfil medio de concentración vs tiempo de pacientes en tratamiento con nilotinib

Los perfiles de concentración plasmática normalizada por la dosis vs tiempo de cuatro pacientes con LMC en tratamiento con nilotinib se muestran en la Figura 3. En todos los tiempos de muestreo, se observa una elevada variabilidad interindividual en la exposición de los pacientes al fármaco (CV >18%) (Figura 4).

### Proyecto financiado por:

Ayudas para promoción de investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación en la Comunitat Valenciana. Conselleria de Educació, Investigació, Cultura y Deporte. Generalitat Valenciana.