

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Rafaela Ferreira Perobelli

**ESTUDO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ENSAIO  
BIOLÓGICO PARA AVALIAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL  
DENOSUMABE**

Santa Maria, RS  
2017

**Rafaela Ferreira Perobelli**

**ESTUDO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ENSAIO BIOLÓGICO PARA  
AVALIAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL DENOSUMABE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora

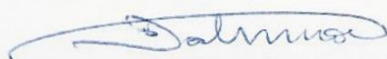
Santa Maria, RS  
2017

**Rafaela Ferreira Perobelli**

**ESTUDO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ENSAIO BIOLÓGICO PARA  
AVALIAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL DENOSUMABE**

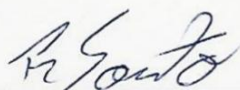
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Aprovado em 27 de julho de 2017:**




---

**Sérgio Luiz Dalmora, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



---

**Ricardo Bizogne Souto, Dr. (URI)**



---

**Carine Viana Silva, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, RS

2017

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Mauro e Leda, com amor dedico este trabalho. A eles, toda a minha gratidão.*

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente agradeço a Deus, pela vida, saúde e sabedoria para concluir mais esta etapa;*

- ao meu orientador, Prof. Sérgio, pela oportunidade, amizade, apoio, confiança, orientação e contribuições;*
- aos meus pais, Mauro e Leda, e ao meu irmão, Julio, pelo amor, incentivo, paciência e apoio incondicional;*
- ao meu namorado, Luiz Augusto, pela motivação, companheirismo, compreensão, amor e carinho;*
- aos meus familiares e amigos, pelo incentivo, companheirismo e compreensão;*
- aos colegas e bolsistas do Centro de Desenvolvimento de Testes e Ensaaios Farmacêuticos (CTEFAR), pelo auxílio, apoio e amizade;*
- aos professores e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial, pelos ensinamentos e colaboração;*
- à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), por viabilizar a execução deste trabalho;*
- à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Tecnologia e Ciência (FATEC), pelo apoio financeiro;*

*Enfim, a todos que de alguma maneira deixaram sua contribuição para a conclusão deste trabalho.*

*“A sua estrada é somente sua.  
Outros podem acompanhá-lo,  
mas ninguém pode andar por você”*

*(Rumi)*

## RESUMO

### ESTUDO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ENSAIO BIOLÓGICO PARA AVALIAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL DENOSUMABE

AUTORA: Rafaela Ferreira Perobelli  
ORIENTADOR: Sérgio Luiz Dalmora

O denosumabe (DmAb) é um anticorpo monoclonal totalmente humano que inibe diretamente a proliferação e atividade de células osteoclásticas e induz um aumento da massa óssea. Estruturalmente, é uma imunoglobulina do tipo IgG<sub>2</sub>, expressa pela tecnologia do DNA recombinante através da clonagem e propagação na linhagem celular CHO. Apresenta massa molecular de 147 kDa. O DmAb encontra-se disponível comercialmente no Brasil, e é indicado clinicamente para o tratamento da osteoporose de alto risco de fraturas em mulheres pós-menopausa e da perda óssea de pacientes submetidos a terapias que causam diminuição hormonal, como câncer de mama e de próstata. Também é recomendado para pacientes com metástase óssea de tumores sólidos. Neste trabalho foram desenvolvidos e validados métodos por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) e cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) para a avaliação de DmAb em produtos biofarmacêuticos. Além disso, foi desenvolvido bioensaio por cultura de células de macrófagos RAW 264,7 *in vitro* para avaliar a atividade biológica. No método por CL-EM utilizou-se coluna TSKGel G2000SW<sub>XL</sub> (300 mm x 7,8 mm d.i.), mantida a 25 °C. A fase móvel foi constituída de solução tampão fosfato de potássio monobásico 1 mM, fosfato de potássio dibásico 8 mM e cloreto de sódio 200 mM, pH 7,4, com eluição isocrática de 1,0 mL/min e detecção por detector de arranjo de diodos (DAD) em 214 nm. No método por CL-FR, foi utilizada coluna Vydac 214TP C<sub>4</sub> (250 mm x 4,6 mm d.i.) mantida a 60 °C, fase móvel constituída de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v/v) em água e TFA 0,1% (v/v) em acetonitrila, com eluição por gradiente, fluxo de 1 mL/min e detecção por DAD em 214 nm. Os tempos de retenção do DmAb foram de 7,6 e 18,2 min, para os métodos por CL-EM e CL-FR, respectivamente. A especificidade foi verificada e confirmada por estudos de degradação forçada, avaliação da interferência dos excipientes da formulação e pureza dos picos. As curvas de calibração dos métodos por CL-EM e CL-FR foram lineares nas faixas de concentração de 5 – 200 µg/mL ( $r^2 = 0,9993$ ) e 5 – 300 µg/mL ( $r^2 = 0,9997$ ) e os limites de detecção e quantificação foram de 1,83 e 5,54 µg/mL e 1,94 e 5,87 µg/mL, respectivamente. As médias da exatidão foram de 100,53 e 100,80%, com bias inferior a 0,84 e 1,25%, respectivamente. O bioensaio *in vitro* foi realizado em células de macrófagos RAW 264,7 que se diferenciaram em osteoclastos pela adição de RANKL e M-CSF, avaliando a capacidade do DmAb em inibir a formação osteoclástica induzida pelo RANKL. Os métodos por CL foram aplicados para a quantificação de DmAb e suas formas degradadas em formulações biofarmacêuticas, e os resultados foram correlacionados com os obtidos pelo bioensaio antiproliferativo da osteoclastogênese, apresentando correlação significativa ( $p < 0,05$ ). Assim, sugere-se que os métodos por CL validados sejam aplicados paralelamente ao bioensaio *in vitro* para aprimorar o controle da qualidade do produto biotecnológico de DmAb, contribuindo para garantir sua segurança e eficácia terapêutica.

**Palavras-chave:** Anticorpo Monoclonal. Denosumabe. Cromatografia Líquida por Exclusão Molecular. Cromatografia Líquida em Fase Reversa. Bioensaio. Validação. Correlação.

## ABSTRACT

### STUDY OF CHROMATOGRAPHY METHODS AND BIOASSAY FOR THE EVALUATION OF MONOCLONAL ANTIBODY DENOSUMAB

AUTHOR: RAFAELA FERREIRA PEROBELLI  
ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Denosumab (DmAb) is a fully human monoclonal antibody that inhibits osteoclast formation, function and survival, reducing bone turnover and resorption. Structurally, it is a fully human immunoglobulin G<sub>2</sub>, yielding a molecular mass of approximately 147 kDa, that was expressed using recombinant DNA technology. DmAb has been approved for the treatment of postmenopausal osteoporosis at increased risk of fracture, to avoid bone loss in hormone-ablation therapy during cancer treatment and for prevention of skeletal related events in patients with bone metastases from solid tumors. In this study, it was developed and validated size-exclusion liquid chromatography (SE-LC) and reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) methods to quantitate DmAb in biopharmaceutical formulations. Equally, an *in vitro* bioassay using cultures of RAW 264.7 macrophages, that served as osteoclast precursors, was developed for the quantitation of DmAb. The analysis for the SE-LC method were performed on a TSKGel G2000SW<sub>XL</sub> column (300 mm × 7,8 mm i.d.) maintained at 25 °C. The mobile phase consisted of 1 mM monobasic potassium phosphate, 8 mM dibasic potassium phosphate and 200 mM sodium chloride, pH 7.4, run isocratically at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup> and detection by a photodiode array detector (PDA) set at 214 nm. The gradient RP-LC method was carried out on a Vydac 214TP C<sub>4</sub> column (250 mm × 4.6 mm i.d.) maintained at 60 °C. The mobile phase consisted of 0.1% v/v trifluoroacetic acid (TFA) in water and 0.1% v/v TFA in acetonitrile, at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>, and detection by a PDA at 214 nm. The chromatographic separation was obtained with retention times of 7.6 and 18.2 min, and the calibration curves were linear over the concentration range of 5 – 200 µg mL<sup>-1</sup> ( $r^2 = 0.9993$ ) and 5 – 300 µg mL<sup>-1</sup> ( $r^2 = 0.9997$ ), respectively, for SE and RP-LC methods. The limits of detection and quantitation were 1.83 and 5.54 µg mL<sup>-1</sup>, respectively, for the SE-LC and 1.94 and 5.87 µg mL<sup>-1</sup>, for the RP-LC. The specificity of the methods was confirmed by degradation studies, interference of the excipients and peaks purity. The accuracy was 100.53 and 100.80%, with bias lower than 0.84 and 1.25%, respectively, for SE and RP-LC. The *in vitro* bioassay was performed based on the ability of DmAb to inhibit the effect of human RANKL to stimulate the formation of osteoclasts derived from RAW 264.7 cells, by the addition of human RANKL and M-CSF. The LC methods were applied for the determination of DmAb and degraded forms in biotechnology-derived products, and the results were correlated to those of the osteoclastogenesis antiproliferative bioassay, showing significant correlation ( $p < 0.05$ ). Thus, it is suggested the application of the methods developed and validated by SE and RP-LC to improve quality control of DmAb biotechnology-derived products, thereby contributing to ensure its safety and therapeutic efficacy.

**Keywords:** Monoclonal Antibody. Denosumab. Size Exclusion Liquid Chromatography. Reversed-Phase Liquid Chromatography. Bioassay. Validation. Correlation.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 1 – Mecanismo de ação do anticorpo monoclonal DmAb..... 22

FIGURA 2 – Estrutura básica do DmAb..... 23

### ARTIGO CIENTÍFICO

FIGURA 1 – Representative SE-LC chromatograms showing peak 1 = denosumab; peak 2 = high molecular weight proteins. (a) Active pharmaceutical ingredient of denosumab; (b) Sample of biopharmaceutical formulation, and after (c) neutral hydrolysis. (d) Placebo..... 50

FIGURA 2 – Representative RP-LC chromatograms showing peak 1 = denosumab, peak 2 = related proteins and peak 3 = hydrogen peroxide. (a) Active pharmaceutical ingredient of denosumab; (b) Sample of biopharmaceutical formulation, and after (c) forced photolytic degradation; (d) forced oxidative degradation. (e) Placebo..... 51

FIGURA 3 – Pareto charts representing the effects of the variables and their interactions investigated during the robustness testing for the determination of DmAb by: (a) SE-LC and (b) RP-LC methods..... 52

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO CIENTÍFICO

TABELA 1 – Variables selected as factors and levels investigated during the robustness testing by the multi-variable-at-a-time procedure for the LC methods.....	45
TABELA 2 – Accuracy of SE–LC and RP–LC for DmAb in the biopharmaceutical formulations.....	46
TABELA 3 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing by the one-variable-at-a-time procedure for the SE–LC method.....	47
TABELA 4 – Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing by the one-variable-at-a-time for the RP–LC method.....	48
TABELA 5 – Comparative quantitation of DmAb in biopharmaceutical formulations, by the LC methods and the osteoclastogenesis antiproliferative bioassay.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BS-DmAb	Substância Biológica de Referência Representativa de DmAb
CATK	Catepsina K
CA2	Anidrase carbônica
CCDA	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
CDC	Citotoxicidade dependente de anticorpo
CHO	Ovário de hamster chinês
CL	Cromatografia líquida
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-EM	Cromatografia líquida por exclusão molecular
CTR	Receptor da calcitonina
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detector de arranjo de diodos
d.i.	Diâmetro interno
DmAb	Denosumabe
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Enzimaimunoensaio
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
EP	Farmacopeia Europeia
ESI-MS-TOF	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray e analisador por tempo de voo
Fab	Fragmento de ligação ao antígeno
Fc	Fragmento cristalizável
FCDA	Fagocitose celular dependente de anticorpo
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos
hPTH	Hormônio da paratireoide humano
ICH	Conferência Internacional de Harmonização
Ig	Imunoglobulina
kg	Quilograma
kDa	Quilodalton
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
mAb	Anticorpo monoclonal
M-CSF	Fator estimulador de colônias de macrófagos
MTT	Tetrazolio brometo de 3-(4.5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazolio
OPG	Osteoprotegerina
pH	Potencial hidrogeniônico
r	Coeficiente de correlação
r <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
RANK	Receptor do fator nuclear kappa B
RANKL	Ligante do receptor do fator nuclear kappa B
SREs	Eventos relacionados ao esqueleto
TFA	Ácido trifluoroacético
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
USP	Farmacopeia Americana

## SUMÁRIO

	<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	13
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
2.1	TECIDO ÓSSEO.....	18
2.2	ANTICORPOS MONOCLONAIS.....	20
2.3	ANTICORPO MONOCLONAL DENOSUMABE.....	22
<b>3</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	29
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	61
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	63
	<b>ANEXO A – ESTRUTURA PRIMÁRIA PROPOSTA PARA AS CADEIAS PESADAS DO DENOSUMABE</b> .....	70
	<b>ANEXO B – ESTRUTURA PRIMÁRIA PROPOSTA PARA AS CADEIAS LEVES DO DENOSUMABE</b> .....	71

## APRESENTAÇÃO

A presente Dissertação de Mestrado segue as recomendações do Manual de Dissertações e Teses (MDT) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) do ano de 2015. O estudo compreende o desenvolvimento e validação de métodos físico-químicos por cromatografia líquida para a quantificação do anticorpo monoclonal denosumabe, bem como o desenvolvimento do ensaio biológico por cultura de células *in vitro* para avaliação da atividade biológica e estudos de correlação. Os resultados obtidos geraram um artigo científico que foi submetido para publicação. As seções **MATERIAL E MÉTODOS**, **RESULTADOS** e **DISCUSSÃO** encontram-se no **ARTIGO CIENTÍFICO**, que apresenta a íntegra da pesquisa realizada. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações nos capítulos **INTRODUÇÃO**, **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e **DISCUSSÃO** da Dissertação, pois as referências utilizadas para a elaboração do artigo estão mencionadas no mesmo.

## INTRODUÇÃO

---

## 1 INTRODUÇÃO

---

Anticorpos monoclonais (mAbs) são imunoglobulinas altamente específicas, produzidas por um único clone de linfócito B. Estruturalmente, são formadas por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas, com domínios Fab e Fc, responsáveis pela ligação antígeno/anticorpo e pela atividade biológica, respectivamente (BREEDVELD, 2000). Os avanços nos estudos da biotecnologia possibilitaram a produção de mAbs totalmente humanos, com alto potencial para aplicação terapêutica (LEWIECKI, 2010; NELSON et al., 2010; ECKER et al., 2015).

O denosumabe (DmAb) é um anticorpo monoclonal totalmente humano, expresso através da clonagem e propagação em linhagem celular de ovário de hamster chinês (CHO), pela tecnologia do DNA recombinante (RIZZOLI et al., 2010). Atualmente, é indicado para tratamento da osteoporose de alto risco de fraturas em mulheres pós-menopausa, e da perda óssea de pacientes submetidos a tratamentos de câncer de mama e de próstata que causem diminuição hormonal. Encontra-se também em uso clínico em pacientes com metástase óssea de tumores sólidos (MOEN; KEAM, 2011).

O mecanismo de ação do DmAb está baseado na sua capacidade de se ligar com alta afinidade e especificidade ao ligante do receptor do fator nuclear kappa B (RANKL) na superfície dos osteoclastos. Esta ação impede que o RANKL se ligue ao receptor do fator nuclear kappa B (RANK), inibindo a formação, função e sobrevivência dos osteoclastos, reduzindo a reabsorção óssea e aumentando a massa óssea (HANLEY et al., 2012).

Os mAbs recombinantes de uso terapêutico apresentam estrutura molecular complexa e heterogênea, e podem conter mesmo após sua purificação, impurezas dos processos de expressão e purificação, bem como produtos de degradação que se formam durante o armazenamento. A presença destas formas alteradas pode afetar a integridade e atividade biológica da biomolécula e causar imunogenicidade (EMA, 2012; PINEDA et al., 2016).

Os mAbs requerem alta especificidade estrutural para interagir com seus antígenos. Por esta razão, guias internacionais enfatizam a importância da completa caracterização destas proteínas, por métodos que sejam capazes de determinar a pureza, propriedades físico-químicas, imunoquímicas, atividade biológica e presença

de formas degradadas dos produtos de uso terapêutico. Deste modo assegurar que os lotes sucessivos de produção tenham qualidade igual ou superior ao submetido aos estudos pré-clínicos e clínicos, durante o processo de registro (ICH, 1999; BRASIL, 2010; EMA, 2016). Técnicas analíticas como a cromatografia líquida (CL), juntamente com ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*, e enzimaímunoensaio (ELISA), tem sido preconizadas para monitorar e caracterizar os mAbs, bem como suas formas degradadas. Porém, não existem descrições de procedimentos e bioensaios oficiais especialmente para o DmAb (EMA, 2016; USP 39, 2016; EP, 2017).

O DmAb, objeto deste estudo, é produzido pela tecnologia do DNA recombinante e encontra-se disponível para uso clínico no Brasil, tendo reflexos diretos na área de saúde pública. Até o presente momento, não existem monografias para sua análise descritas em compêndios oficiais. Neste contexto, justifica-se o desenvolvimento e validação de tecnologias analíticas para avaliação de identidade, pureza, teor/potência e estabilidade de DmAb.

O presente trabalho teve por objetivos: a) desenvolver e validar método por cromatografia líquida por exclusão molecular (CL–EM) para quantificação de DmAb e de proteínas de alta massa molecular; b) desenvolver e validar método por cromatografia líquida em fase reversa (CL–FR) para avaliação da forma não alterada e de proteínas relacionadas; c) desenvolver ensaio biológico por cultura de células *in vitro* para avaliação de potência de DmAb e das formas degradadas; d) avaliar correlações entre os métodos físico-químicos e biológico e aplicá-los para avaliação de potência dos produtos biotecnológicos disponíveis no País.



## REVISÃO DA LITERATURA

---

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1 TECIDO ÓSSEO

O osso é um tecido mineralizado composto basicamente por colágeno tipo I, cálcio e fosfato. A matriz óssea está em constante remodelação, fundamental para renovar sua microarquitetura e conservar o conteúdo mineral. O tecido ósseo está sob controle de hormônios, fatores de crescimento e citocinas, mantendo a relação dos sistemas imune e esquelético. Sua homeostase depende da atividade equilibrada entre as células de formação e reabsorção óssea, denominadas osteoblastos e osteoclastos, respectivamente (IKEDA; TAKESHITA, 2014; FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Os osteoblastos são células mononucleares que se originam a partir de células progenitoras mesenquimatosas da medula óssea, e tem como funções a síntese da matriz extracelular mineralizada (calcificada) e o controle da mineralização. Os osteoclastos são células multinucleadas que tem origem hematopoiética e são formados por processo chamado de osteoclastogênese. A principal função dos osteoclastos, quando ativados, é liberar, dos ossos para o sangue, cálcio, fósforo inorgânico e fragmentos de colágeno (HARADA; RODAN, 2003).

Os precursores osteoclásticos derivam de pró-monócitos, que se diferenciam em monócitos/macrófagos, células dendríticas ou osteoclastos. A diferenciação e formação osteoclástica é regulada por diferentes células, sobretudo por osteoblastos, que expressam três moléculas essenciais: fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), responsável pela sobrevivência e proliferação destes precursores, ligante do receptor do fator kappa B (RANKL) e osteoprotegerina (OPG), uma proteína que atua como inibidora da maturação e ativação dos osteoclastos (BOYCE, 2013).

Em situações fisiológicas, na osteoclastogênese, os precursores osteoclásticos migram pela corrente sanguínea até os ossos e aderem à sua superfície. O M-CSF se liga aos receptores de membrana das células precursoras e induz a expressão do receptor do fator nuclear kappa B (RANK) na superfície dessas células. A diferenciação é iniciada pela ligação do RANKL ao RANK, que leva a expressão de genes que caracterizam a linhagem osteoclástica: fosfatase ácida

resistente ao tartarato (TRAP), catepsina K (CATK), receptor da calcitonina (CTR) e anidrase carbônica (CA2). A diferenciação/proliferação é inibida quando a OPG se liga ao RANKL e bloqueia sua ligação ao RANK (BOYLE et al., 2003; KIM; KIM, 2014).

A remodelação óssea é um processo dinâmico e contínuo que se baseia em dois processos simultâneos e antagônicos: formação e reabsorção. O hormônio da paratireoide humano (hPTH) é secretado em resposta à hipocalcemia e nos ossos, determina a ativação e recrutamento dos osteoclastos, pela liberação de M-CSF e RANKL pelos osteoblastos. Os osteoclastos ativados aproximam-se da superfície óssea e secretam ácidos e enzimas hidrolíticas que reabsorvem os ossos, liberando cálcio, fósforo inorgânico e fragmentos de colágeno, aumentando o fluxo de íons cálcio para o sangue. A hipercalcemia, por sua vez, inibe a secreção do hPTH e estimula a secreção de calcitonina, que promove aumento da atividade osteoblástica e a deposição de cálcio nos ossos, acarretando maior síntese óssea (RAGGATT; PARTRIDGE, 2010).

Desequilíbrios no processo de remodelação podem resultar em alterações na estrutura e função do esqueleto. Em condições patológicas como na osteoporose pós-menopausa e em neoplasias e metástases ósseas, pode ocorrer aumento na reabsorção óssea osteoclástica em relação a formação óssea osteoblástica, com perda acelerada de massa óssea, que fragiliza os ossos e eleva o risco de fraturas (SÀNCHEZ-RIERA et al., 2010; PIETSCHMANN et al., 2016).

A determinação de marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo permite a avaliação das condições da remodelação, pois retratam a formação/reabsorção e são importantes para o diagnóstico, definição terapêutica e monitoramento da evolução das doenças. Como a formação está associada à ação dos osteoblastos e a reabsorção com a atividade dos osteoclastos, os biomarcadores fosfatase alcalina e TRAP permitem determinar os produtos decorrentes da ação dessas células, respectivamente (VIEIRA, 2007; HLAING; COMPSTON, 2014).

A osteoporose é uma doença óssea assintomática e é considerada um problema de saúde pública, uma vez que a incidência de fraturas tende a aumentar com o passar dos anos. A prevenção da doença inclui a prática de exercícios físicos, cuidados com a alimentação, complementação de cálcio e vitamina D e medidas para prevenção de quedas. O emprego terapêutico de fármacos é indicado para pacientes com alto risco para fraturas, com a finalidade da prevenção (BRATS,

2013; COMPSTON et al., 2017). Agentes anabólicos de formação óssea, como o hormônio da paratireoide humano recombinante, restauram a massa óssea através do estímulo da atividade osteoblástica. Porém, a grande maioria dos medicamentos disponíveis inibem a reabsorção óssea osteoclástica, e incluem bisfosfonatos, moduladores seletivos do receptor de estrogênio, calcitonina e anticorpo monoclonal (COSMAN et al., 2014).

As metástases ósseas são praticamente incuráveis e surgem com maior frequência de carcinomas de pulmão, mama, tireoide e rins. Sabe-se que a estimulação da reabsorção óssea aumenta a taxa de proliferação de células tumorais nos ossos, e que essas células promovem a formação e atividade do osteoclastos, num ciclo que atrai e estimula mais células tumorais. As complicações da doença afetam negativamente a qualidade de vida dos pacientes e incluem hipercalcemia, perda da integridade óssea, aumento no risco de fraturas, dor crônica e desenvolvimento de compressão da medula espinhal, chamadas de eventos relacionados ao esqueleto (SREs). O tratamento é paliativo e pode incluir radioterapia, radiofármacos, quimioterapia ou terapia hormonal sistêmica e uso de bisfosfonatos e anticorpo monoclonal (CRUZ, 2011).

## 2.2. ANTICORPOS MONOCLONAIS

Anticorpos são imunoglobulinas (Ig) secretadas fisiologicamente por linfócitos B com capacidade de detectar, inativar ou eliminar antígenos. Estruturalmente, são formados por quatro cadeias polipeptídicas (duas leves e duas pesadas) que se ligam em forma da letra “Y” e se dividem em fragmentos de reconhecimento e ligação ao antígeno (Fab) e fragmentos cristalizáveis (Fc), responsáveis pela função efetora. As Ig são divididas em cinco classes de acordo com a estrutura da cadeia pesada, sendo elas: IgA, IgG, IgM, IgD e IgE. As IgG são constituídas por quatro subclasses (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> e IgG<sub>4</sub>) e exercem funções biológicas importantes por interagirem com vários tipos celulares, estimulando respostas diretamente relacionadas com a eliminação de antígenos (BUSS et al., 2012).

Anticorpos monoclonais (mAbs) são imunoglobulinas produzidas em laboratório pelo clone de um único linfócito secretor do anticorpo para o antígeno correspondente. Os primeiros mAbs desenvolvidos foram chamados de murinos,

mas quando administrados como medicamento, geravam reações imunogênicas ao paciente. Foram então estudados produtos menos imunogênicos, que levaram a produção dos mAbs quiméricos e humanos, mas que ainda assim, causavam reações. Os avanços na área de biotecnologia possibilitaram a produção de mAbs totalmente humanos, pela tecnologia do DNA recombinante. Os mAbs recombinantes têm sido utilizados na terapia de diversas doenças, devido à alta afinidade e especificidade, baixa imunogenicidade e elevada meia-vida biológica (REA et al., 2012).

Os mAbs de uso terapêutico pertencem a classe IgG. Sua atividade biológica é mediada pela ligação específica ao epítipo do antígeno correspondente, e o mecanismo de ação e o alvo celular dependem da subclasse a qual pertencem. De maneira geral, as IgG<sub>1</sub> e IgG<sub>3</sub>, reconhecem antígenos de superfície celular e são projetadas para matar células alvo através da mediação das funções efetoras imunes, como citotoxicidade dependente de complemento (CDC), citotoxicidade celular dependente de anticorpo (CCDA) e fagocitose celular dependente de anticorpo (FCDA). As IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>4</sub> também reconhecem antígenos, mas não são projetadas para matar a célula alvo. Seu mecanismo de ação está principalmente baseado em reconhecer antígenos solúveis ou da superfície celular e bloquear as interações com receptores celulares (JIANG et al., 2011).

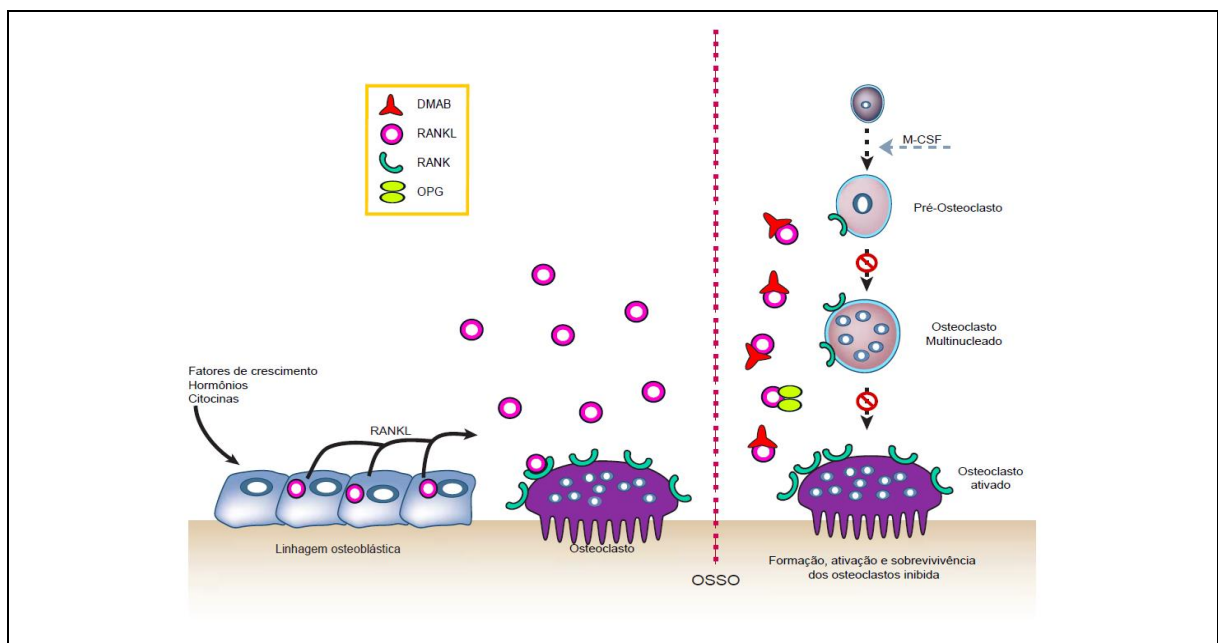
Os processos de produção dos mAbs são complexos e os produtos são suscetíveis a degradação em todos os estágios de produção, como fermentação e purificação, até o armazenamento e administração. Várias vias químicas e físicas, tais como desamidação, oxidação, hidrólise/fragmentação, isomerização e agregação, são responsáveis pela sua degradação. A agregação é exacerbada quando o mAb precisa ser formulado em altas concentrações, para administração subcutânea. A quantificação destes componentes no produto biofarmacêutico é importante para avaliar os atributos de qualidade da biomolécula, pois podem comprometer sua segurança e eficácia (CHIRINO; MIRE-SLUIS, 2004; WANG et al., 2009; VA´ZQUEZ-REY; LANG, 2011; WHO, 2013; ROBERTS, 2014).

### 2.3. ANTICORPO MONOCLONAL DENOSUMABE

A identificação RANK/RANKL/OPG permitiu melhor entendimento dos mecanismos que regulam a formação e atividade dos osteoclastos. Desta forma, se avançou para explorar a remodelação óssea como estratégia terapêutica para patologias que afetam a reabsorção óssea. O denosumabe (DmAb) foi o primeiro anticorpo monoclonal aprovado para uso clínico que age inibindo a reabsorção óssea osteoclástica (BARON et al., 2011; RACHNER et al., 2011; COMPSTON et al., 2017).

Fisiologicamente, o DmAb atua no metabolismo ósseo como um anticorpo anti-RANKL, de maneira semelhante à OPG, interferindo nas interações ligante/receptor, do seguinte modo: o DmAb se liga com alta afinidade e especificidade ao RANKL, impedindo sua ligação ao RANK. Esta ação inibe a ligação RANKL/RANK na superfície osteoclástica, inibindo a formação, ativação, função e sobrevivência dos osteoclastos, conforme mostrado na Figura 1. Com isso, ocorre uma redução na reabsorção óssea, impedindo a perda exagerada de massa óssea (HANLEY et al., 2012).

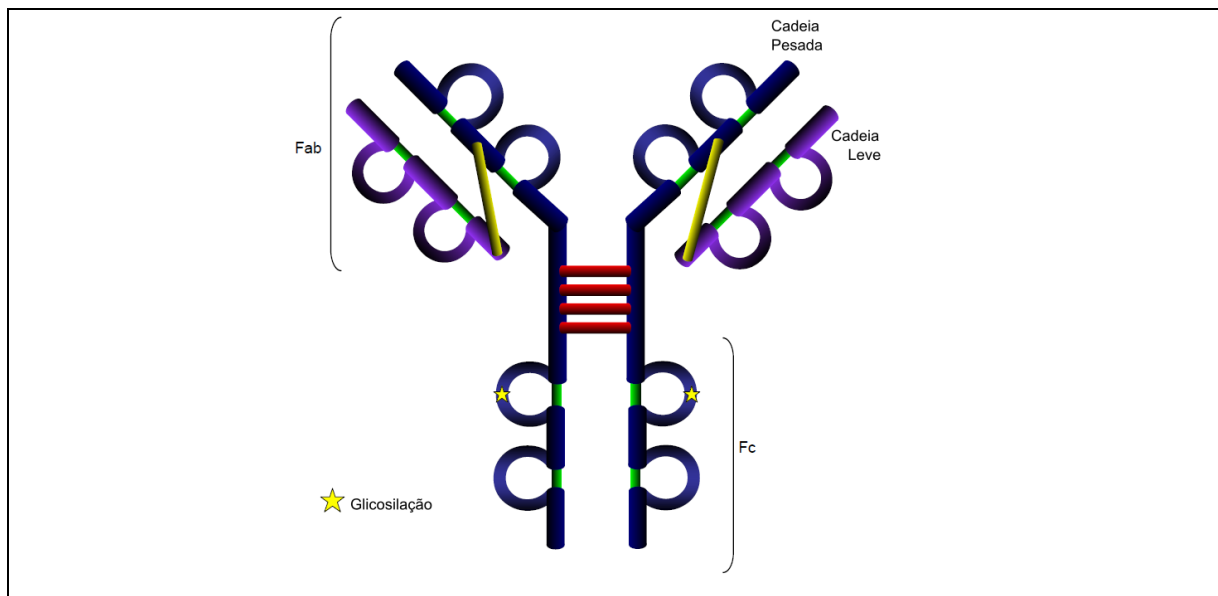
Figura 1 – Mecanismo de ação do DmAb.



Fonte: Adaptação de BOYLE et al. (2003, p. 341); MILLER (2009, p. 19).

O DmAb é produzido pela tecnologia do DNA recombinante por clonagem e expressão em células de ovário de hamster chinês (CHO). Estruturalmente, é uma IgG<sub>2</sub>, com massa molecular de 147 kDa e fórmula química C<sub>6404</sub>H<sub>9912</sub>N<sub>1724</sub>O<sub>2004</sub>S<sub>50</sub>, formada por duas cadeias pesadas da subclasse gama e por duas cadeias leves da subclasse kappa, conforme mostrado na Figura 2. Cada cadeia pesada é constituída por 447 aminoácidos (anexo A), com 4 pontes dissulfeto intramoleculares e sítios de N-glicosilação na Asparagina 298, onde se ligam estruturas com resíduos de ácido siálico e galactose, responsáveis por sua atividade biológica. Cada cadeia leve é composta por 215 aminoácidos (anexo B), com duas pontes dissulfeto intramoleculares (LACEY et al., 2012; AMGEN, 2016a).

Figura 2 – Estrutura básica do DmAb.



Fonte: Adaptação de AMGEN (2015, p. 1).

O DmAb encontra-se disponível para uso clínico no Brasil como produtos biofarmacêuticos denominados Prolia® e Xgeva®, produzidos pelo laboratório Amgen. O Prolia® apresenta-se na forma de solução injetável, límpida, incolor a ligeiramente amarelada, formulada com pH de 5,2 na concentração de 60 mg. Os excipientes que compõem sua formulação são ácido acético glacial, hidróxido de sódio, sorbitol, polissorbato 20 e água para injetáveis. O produto é fornecido em seringa preenchida

com volume de 1,0 mL e o prazo de validade é de 24 meses. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) concedeu seu primeiro registro como produto biológico novo em 2011 (AMGEN, 2016a).

Na clínica, o Prolia<sup>®</sup> é indicado para o tratamento de osteoporose com alto risco de fraturas em homens e em mulheres pós-menopausa. Além disso, é recomendado para aumentar a massa óssea de mulheres que fazem uso de inibidores de aromatase e de homens que recebem terapia de supressão androgênica, para câncer de mama e de próstata não-metastático (CUMMINGS et al., 2009). A dose recomendada é de 60 mg a cada 6 meses e deve ser administrado por injeção via subcutânea na coxa, abdômen ou face posterior do braço. Na prática clínica, tem sido indicado para pacientes com problemas gastrointestinais ou efeitos colaterais a terapias com bisfosfonatos. A administração subcutânea a cada seis meses possibilita uma melhor adesão do paciente ao tratamento, uma vez que outros medicamentos são de uso contínuo e diário (LEWIECKI, 2010).

O Xgeva<sup>®</sup> apresenta-se na forma de solução injetável com concentração de 120 mg, formulado com pH de 5,2. Os excipientes da formulação incluem ácido acético glacial, hidróxido de sódio, sorbitol e água para injetáveis. O produto é fornecido em frasco-ampola com volume de 1,7 mL e prazo de validade de 36 meses. Seu primeiro registro foi concedido pela Anvisa como produto biológico novo em 2011. Na clínica, vem sendo indicado para pacientes com metástase óssea de tumores sólidos, com a finalidade de reduzir/eliminar células osteoclásticas gigantes e prevenir os SREs associados a doença. A dose recomendada é de um frasco-ampola a cada 4 semanas, que deve ser administrado por via subcutânea na coxa, abdômen ou face posterior do braço (BRANSTETTER et al., 2012; AMGEN, 2016b).

Estudos de farmacocinética foram realizados em indivíduos saudáveis e mulheres na pós-menopausa com osteopenia ou osteoporose por injeção intravenosa e subcutânea, respectivamente, de DmAb (Prolia<sup>®</sup>), com doses que variaram entre 0,01 e 3 mg/kg, administradas de 3 a 6 meses, por até 4 anos. Os resultados demonstraram relação não linear entre a farmacocinética e a dose do DmAb (SUTJANDRA et al., 2011).

A atividade biológica dos mAbs tem sido avaliada por ensaios biológicos *in vivo* e/ou *in vitro*, com base no mecanismo de ação de cada produto, tal como o bioensaio para determinar a atividade CCDA das imunoglobulinas do tipo IgG<sub>1</sub> e



IgG<sub>3</sub>. A quantificação da atividade biológica é expressa através de métodos imunoenzimáticos (ELISA), fundamentados na ligação antígeno-anticorpo. No entanto, a principal desvantagem dos bioensaios é sua precisão, que é geralmente inferior à de técnicas físico-químicas (SCHNUERIGER et al., 2011; EMA, 2016; EP, 2017).

Hofbauer e colaboradores (2009) avaliaram a eficácia do DmAb contra o RANKL, no modelo murino de osteoporose induzida por glicocorticoide. Foram utilizados camundongos geneticamente modificados pela inserção do RANKL humano, que receberam DmAb ou placebo. A perda óssea foi associada com a supressão da formação de ossos vertebrais e aumento da reabsorção óssea, evidenciada pelo aumento de células osteoclásticas, determinada através do biomarcador TRAP. O DmAb preveniu a perda óssea induzida pela administração de prednisolona durante 4 semanas.

Helas e colaboradores (2009) avaliaram o efeito do DmAb na dose de 10 mg/kg, administrado duas vezes por semana, sobre a calcificação vascular da aorta induzida pelo tratamento com prednisolona na dose de 2,1 mg/kg/dia, em camundongos geneticamente modificados pela inserção do RANKL humano. A prednisolona induziu aumento da reabsorção óssea, que elevou os teores de cálcio e fosfato na aorta, reduzidos pelo tratamento com DmAb durante 4 semanas.

Kostenuik e colaboradores (2009) avaliaram a atividade biológica do DmAb e OPG *in vivo*, em camundongos BDF1 com 4 semanas de idade, e hipercalcemia induzida pela adição de RANKL humano. Após duas injeções diárias de RANKL por 4 dias, observou-se aumento significativo no cálcio ionizado no sangue, que foi reduzido após injeções de DmAb e OPG. Além disso, os autores avaliaram a atividade do DmAb e da OPG *in vitro*, pelo bioensaio por cultura de células murinas de macrófagos (RAW 264,7), utilizadas como precursoras osteoclásticas. A diferenciação em osteoclastos foi estimulada pela adição de M-CSF (30 ng/mL) e RANKL humano (30 ng/mL). As células foram tratadas com DmAb e OPG e a resposta foi quantificada pela determinação do biomarcador de reabsorção óssea TRAP por espectrofotometria em 405 nm. Os dados demonstraram maior capacidade do DmAb para inibir a proliferação celular em relação a OPG.

Tyagi e colaboradores (2016) também induziram a formação de osteoclastos em células RAW 264,7 pela adição de RANKL humano e avaliaram a inibição da

osteoclastogênese e diminuição da viabilidade celular, pela adição do corante MTT e leitura espectrofotométrica em 570 nm.

Guias internacionais e as farmacopeias, nos métodos gerais, recomendam a quantificação dos mAbs através de ensaios físico-químicos e imunoquímicos (EMA, 2016; USP 39, 2016; EP, 2017). Técnicas analíticas por cromatografia líquida (CL) têm sido desenvolvidas e aplicadas para análise de mAbs e outros produtos biotecnológicos, por viabilizarem sua separação, identificação, caracterização e quantificação, podendo também ser utilizadas em combinação ou como alternativa aos bioensaios *in vivo* e *in vitro* (LIU et al., 2009; NAVAS et al., 2013; ALMEIDA et al., 2014; ZHANG et al., 2014; CARDOSO et al., 2017).

Swamulu e colaboradores (2012) desenvolveram e validaram método por CL-FR para análise de DmAb em formulação biofarmacêutica. Foi utilizada coluna C<sub>18</sub> (250 × 4,6 mm d.i., 5 µm) mantida à temperatura ambiente. A fase móvel foi composta por metanol, água e ortoftaldeído (90:10:01, v/v), com eluição isocrática de 1 mL/min e detecção no comprimento de onda de 233 nm. O tempo de retenção do DmAb foi de 3,64 min.

A ligação estequiométrica do DmAb ao RANKL, simulando condições fisiológicas relevantes, foi determinada *in vitro* por técnicas de separação por tamanho molecular que incluíram CL-EM com detector de espalhamento de luz estática e velocidade de sedimentação com ultracentrifugação e também por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e analisador por tempo de voo (ESI-MS-TOF). Foram testadas diferentes concentrações, demonstrando que a ligação de 3 moléculas de DmAb com 2 trímeros do RANKL é a mais estável (ARTHUR et al., 2012).

Método por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS) no modo tandem foi desenvolvido e validado na região linear de 3,13 – 200 ng/mL. Camadas magnéticas foram ligadas em placa com anticorpo comercial com a região Fc anti-humana para capturar o complexo imune antígeno-anticorpo (RANKL-DmAb) em plasma de camundongo, com subsequente quantificação do antígeno derivado da digestão trípica por LC-MS/MS. O método foi adotado para quantificar o RANKL total na presença de DmAb em estudo de farmacocinética em camundongos (ONAMI et al., 2014).

A cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) explora as propriedades hidrofóbicas das moléculas e tem sido aplicada para quantificação de formas

oxidadas e desamidadas das proteínas (FEKETE et al., 2012). A cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) é referência para avaliação qualitativa e quantitativa de proteínas na sua configuração nativa e de formas agregadas (FEKETE et al., 2014; WU et al., 2014). Diversos autores destacam as vantagens destes métodos na área biofarmacêutica, entre as quais se pode destacar duração de análise, custos adequados e facilidade de execução em relação aos bioensaios *in vivo* e *in vitro* (XINDU; LILI, 2008; MANNING et al., 2010).

Além do desenvolvimento de métodos analíticos, a validação é necessária para garantir a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. Porém, é fundamental demonstrar com dados experimentais que são adequados para a finalidade pretendida (SHABIR, 2003; ROZET, et al., 2007; SHABIR, et al., 2007). Os procedimentos, parâmetros a serem avaliados e as especificações para a validação encontram-se disponíveis em guias oficiais (ICH, 2005; FDA, 2015) e em dissertações e teses já desenvolvidas no Laboratório de Produtos Biológicos da Universidade Federal de Santa Maria (STAMM, 2013; SOUTO, 2015), bem como no artigo científico desta dissertação, o qual está anexado a seguir (Capítulo 3).

**ARTIGO CIENTÍFICO**

---

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

---

#### **Evaluation of monoclonal antibody Denosumab by validated LC methods and their correlation with bioassay**

Rafaela Ferreira Perobelli, Bruna Xavier, Alice Rosa da Silveira, Gabriel Lunardi Remuzzi, Luís Gustavo Jung Motta e Sérgio Luiz Dalmora.

Submetido para publicação.

**Evaluation of monoclonal antibody Denosumab by validated LC methods and their correlation with bioassay**

Rafaela Ferreira Perobelli<sup>2</sup>, Bruna Xavier<sup>2</sup>, Alice Rosa da Silveira<sup>1</sup>, Gabriel Lunardi Remuzzi<sup>1</sup>, Luís Gustavo Jung Motta<sup>1</sup> and Sérgio Luiz Dalmora<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Industrial Pharmacy and <sup>2</sup>Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105–900 Santa Maria – RS, Brazil

\*Corresponding Author: Sérgio Luiz Dalmora, PhD

Federal University of Santa Maria, Santa Maria, 97105–900, Brazil

E-mail: sdalmora@terra.com.br

Fax: +55 55 32208952

## ABSTRACT

The fully human monoclonal antibody Denosumab (DmAb) is produced by recombinant DNA technology and is clinically used to treat osteoporosis and bone loss in patients with hormone-treated prostate or breast cancer. Size exclusion liquid chromatography (SE-LC) and reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) methods were validated for the quantitation of the biotechnology-derived medicine. The SE-LC method was carried out on a TSKGel G2000SW<sub>XL</sub> column (300 mm × 7.8 mm i.d.) maintained at 25 °C. The mobile phase consisted of 200 mM sodium chloride, 8 mM dibasic potassium phosphate and 1 mM monobasic potassium phosphate buffer, pH 7.4, run isocratically at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. The gradient RP-LC method was carried out on a Vydac 214TP C<sub>4</sub> column (250 mm × 4.6 mm i.d.) maintained at 60 °C. The mobile phase A consisted of 0.1% v/v trifluoroacetic acid (TFA) in water and mobile phase B consisted of 0.1% v/v TFA in acetonitrile, run at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>. Retention times were 7.6 and 18.2 min, and calibration curves were linear over the concentration range of 5 – 200 µg mL<sup>-1</sup> ( $r^2 = 0.9993$ ) and 5 – 300 µg mL<sup>-1</sup> ( $r^2 = 0.9997$ ), respectively, with detection by a photodiode array detector (PDA) set at 214 nm. The results of the chromatographic methods were correlated to those of the osteoclastogenesis antiproliferative bioassay, performed on the RAW 264.7 cell line, showing their capabilities for the quantitation of DmAb, contributing to improve the quality control and to ensure the batch-to-batch consistency and efficacy of the biotherapeutic.

## 1. INTRODUCTION

Monoclonal antibodies (mAbs) are immunoglobulins produced by a single clone of B cells. Recombinant engineering techniques allowed the construction of fully human mAbs customized for the binding site but with variations in configuration and effector functions [1]. Denosumab (DmAb) is a fully human monoclonal antibody with affinity and specificity for the human nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) that inhibits RANKL from activating its receptor, the nuclear factor- $\kappa$ B receptor (RANK), on the surface of osteoclasts and their precursors. Prevention of RANKL-RANK interaction inhibits osteoclast formation, function and survival, thereby decreasing bone resorption, and increasing bone mass and strength [2]. Clinically, DmAb belongs to a category of targeted therapeutic agents approved for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis at high risk of fracture, bone loss in patients with hormone-treated prostate or breast cancer and giant-cell tumor of bone [3 – 5].

DmAb was developed using transgenic mouse technology, and produced in genetically engineered mammalian cells (Chinese Hamster Ovary) by a batch-wise cell culture process [6]. Structurally, it is a full-length of human IgG2 monoclonal antibody heterotetramer consisting of 2 heavy chains of the gamma 2 subclass, and 2 light chains of the kappa subclass, yielding a molecular mass of approximately 147 kDa. Each heavy chain contains 447 amino acids with 4 intramolecular disulfides bonds, and N-linked glycan at the consensus glycosylation site at asparagine 298. Besides, each light chain contain 215 amino acids, with 2 intramolecular disulfides bridges. Thus, it contains 36 total cysteine residues, which are involved in both intrachain and interchain disulfide bonds [7 – 8].

Biological activity was assessed by an *in vivo* assay evaluating the ability of human RANKL (hRANKL) to bind murine RANK and to stimulate bone resorption in mice, expressing an extracellular fragment of hRANKL in a manner that could be inhibited by DmAb. An *in vitro* bioassay based on the ability of DmAb to inhibit the effect of hRANKL to stimulate the formation of osteoclasts derived from murine RAW 264.7, stimulated to form osteoclasts by the addition of hRANKL and M-CSF, was developed quantifying tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) as the response, and measuring the absorbance at 405 nm [9]. A cell proliferation assay based on the suppression of RANKL-induced osteoclast differentiation of macrophages into osteoclasts using RAW 264.7 cells, and measuring mitochondrial



dehydrogenase activity with MTT as the substrate was also used to evaluate osteoclastogenesis [10].

Therapeutic proteins such as mAbs have the potential to be affected by one or more forms of heterogeneity. Then, due to their inherent complexity and for safety reasons, there is a need to develop powerful analytical methods to provide their detailed characterization [11 – 13]. Physicochemical techniques cannot predict the biological activity yet, but they can provide information about the structure and composition. Liquid chromatography (LC) has been successfully applied to monitor content, purity, identity and chemical stability of mAbs [14 – 18]. Reversed-phase liquid chromatography (RP-LC) is highly accurate and sensitive for the analysis of related protein variants or degradation products. Given the macromolecular nature of mAbs, size-exclusion liquid chromatography (SE-LC) has also been applied for the quantification and to determine the native size and to reveal possible aggregates that can form during expression, purification and processing, as well as upon storage and administration, and can cause unwanted immune responses and loss of biological activity [19 – 21].

This study aimed to develop and validate specific SE-LC and RP-LC methods to quantitate DmAb in biotechnology-derived-medicine, to correlate the results with an *in vitro* bioassay and to evaluate the bioactivity of higher molecular weight forms and related proteins. Thus, contributing to the development of methods to monitor stability, improve the quality control, and thereby assuring the efficacy of the biotherapeutic.

## **2. EXPERIMENTAL**

### **2.1 Chemicals and reagents**

Batches of Xgeva<sup>®</sup> Amgen (São Paulo, Brazil), containing 120 mg 1.7 mL<sup>-1</sup> in their shelf life period, were used as a representative DmAb biological reference substance (BS-DmAb). Batches of Prolia<sup>®</sup> Amgen, containing 60 mg mL<sup>-1</sup> solution in a prefilled syringe, were acquired from commercial sources within their shelf life period. Potassium phosphate monobasic and dibasic, sodium chloride, sorbitol, sodium acetate, polysorbate 20, sodium hydroxide, acetonitrile, trifluoroacetic acid (TFA) and hydrogen peroxide 30% v/v (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were used as reagents, solvents or excipients and were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). All the other chemicals used were of HPLC grade or special analytical grade. Dulbecco's modified Eagle's medium

(DMEM), fetal bovine serum (FBS) and alamarBlue™ cell viability reagent were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) was obtained from National Institute for Biological Standards and Control – NIBSC (Herts, UK) and hRANKL was obtained from ABCAM (San Francisco, CA, USA), respectively. For all the analyses, ultrapure water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system from Millipore (Bedford, MA, USA). All solutions were degassed with ultrasonicator Tecnal (São Paulo, SP, Brazil) and filtered through a 0.22 µm Millex filters Millipore.

## 2.2 Apparatus

SE-LC and RP-LC analyses were carried out on a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan) equipped with a CBM-20A system controller, a LC-20 AD pump, a DGU-20As degasser, a SIL-20AC<sub>HT</sub> autosampler, a CTO-20A column oven and a SPD-M20A photodiode array detector (PDA). Peak areas were automatically integrated in the computer by using a LC Solution version 1.22 SP1 software program. The absorbances of the *in vitro* cell culture bioassay were measured on a Varioskan® Flash microplate reader Thermo Scientific® (Vantaa, Finland).

## 2.3 Samples and standard solutions

Three commercial batches of Xgeva® were pooled and used as the representative BS-DmAb. Stock solutions were prepared by diluting the BS-DmAb and the sample of biopharmaceutical formulations in ultrapure water to a final concentration of 1 000 µg mL<sup>-1</sup>. The solutions were stored at 2 – 8 °C protected from light and daily diluted with ultrapure water to a working concentration of 50 and 100 µg mL<sup>-1</sup>, respectively, for SE-LC and RP-LC.

## 2.4 Procedures

### 2.4.1 SE-LC

The experiments were accomplished on a size-exclusion Tosoh Bioscience (Tokyo, Japan) TSKGel G2000SW<sub>XL</sub> column (300 mm × 7.8 mm i.d., with a particle size of 5 µm and pore size of 125 Å) maintained at 25 °C. A security guard holder was used to protect the analytical column. The mobile phase consisted of 200 mM sodium chloride, 8 mM dibasic potassium phosphate and 1 mM monobasic potassium phosphate buffer, pH 7.4. The analyses were run in the isocratic mode at a flow rate

of 1.0 mL min<sup>-1</sup>, with detection by PDA set at 214 nm. The injection volume was 50 µL.

#### **2.4.2 RP-LC**

The experiments were performed on a reversed-phase Grace Alltech (Torrance, CA, USA) Vydac 214TP C<sub>4</sub> column (250 mm × 4.6 mm i.d., with a particle size of 5 µm and pore size of 300 Å) maintained at 60 °C. A security guard holder was used to protect the analytical column. The mobile phase A consisted of 0.1% v/v TFA in water and mobile phase B consisted of 0.1% v/v TFA in acetonitrile, run as follows: time 0 – 0.1 min 0% of B; from 0.1 – 10 min linear up to 40% of B; from 10 – 20 min 40% of B; from 20 – 25 min linear down to 0% of B. The flow rate was 1.0 mL min<sup>-1</sup>, with detection by PDA set at 214 nm. The injection volume was 50 µL.

#### **2.4.3 Osteoclastogenesis antiproliferative bioassay *in vitro***

The *in vitro* cell culture bioassay was performed as described elsewhere and adjusted [9, 10]. The inhibition of osteoclast formation activity of DmAb was assessed on the RAW 264.7 cell line of macrophages (ATCC® TIB-71™), that served as osteoclast precursors. The cells were maintained in DMEM culture medium supplemented with 10% v/v FBS in 75 cm<sup>2</sup> flasks. The cells were seeded in 96-well microplates BD Biosciences (San Jose, USA) at a density of 6 × 10<sup>3</sup> cells mL<sup>-1</sup> and were incubated at 37 °C, 5% v/v CO<sub>2</sub> with GM-CSF (30 ng mL<sup>-1</sup>), and hRANKL peptide (30 ng mL<sup>-1</sup>) for 5 days to stimulate the osteoclastogenesis. Then, the cultures were dosed upon seeding with four concentrations (ten-fold dilution series) range starting with 10 µg mL<sup>-1</sup> of DmAb, in triplicate, as a parallel line assay. The BS-DmAb was used as standard and the control was DMEM. The plates were incubated at 37 °C, 5% v/v CO<sub>2</sub> for 4 days. Then, 20 µL of alamarBlue™ was added per well, and the plates were incubated for a further 4 h. The response was calculated as the difference between the absorbances measured at 570 and 600 nm. The biological activity was calculated by the parallel line statistical method by using the CombiStats™ software developed by the European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) of the Council of Europe (Strasbourg, France).

### **2.5 Validation of LC methods**

Validation of both SE-LC and RP-LC methods was performed by using samples of biopharmaceutical formulation with a label claim of  $60 \text{ mg mL}^{-1}$ . Specificity, linearity, range, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), robustness, and system suitability test, were assessed following the guidelines [22, 23].

### **2.5.1 Specificity**

The specificity of the SE-LC method was assessed by subjecting a BS-DmAb solution and a sample of the biopharmaceutical formulation ( $1\ 000 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) to a neutral hydrolysis ( $45 \text{ }^\circ\text{C}$ , for 2 h) and shaking for 1 h. Solutions were then diluted with ultrapure water to the final concentrations of  $50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ . For the RP-LC, a BS-DmAb solution and a sample of biopharmaceutical formulation ( $1\ 000 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were subjected to photodegradation exposing the sample to  $200 \text{ W h/m}^2$  near-ultraviolet light in a photostability chamber for 20 h. Also, the oxidative condition induced by 3% v/v hydrogen peroxide for 30 h was studied. Then, the solutions were diluted with ultrapure water to a final concentrations of  $100 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ . In addition, possible interference from excipients of the biopharmaceutical formulation was determined by analyzing a sample that contained only placebo (in-house mixture of formulation excipients) only. The specificity of the LC methods was established by determining the peaks purity with a PDA detector.

### **2.5.2 Linearity**

The linearity of the SE-LC and RP-LC methods was determined by constructing three independent analytical curves, each one with eight concentrations of the BS-DmAb solution, over the  $5 - 200$  and  $5 - 300 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  range, respectively. Three replicates of  $50 \text{ }\mu\text{L}$  injections of the reference solutions were used to verify the repeatability of the detector response. Peak areas were plotted against the respective concentrations of BS-DmAb solution and subjected to regression analysis by a least-squares method to calculate the calibration equation and the determination coefficient.

### **2.5.3 Precision and accuracy**

Precision was determined by means of repeatability (intra-day) and intermediate precision. Repeatability was examined by six evaluations of a sample of DmAb on

the same day, under the same experimental conditions. The intermediate precision of the methods was assessed by analysis of two samples of the biopharmaceutical formulation on three different days (inter-days) and also by submitting the samples to analysis by other analysts in the same laboratory (between-analysts). The accuracy was assessed applying the proposed methods to the analysis of the in-house mixture of the excipients with known amounts of the biomolecule to obtain solutions at concentrations of 40, 50, 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for the SE-LC, and 80, 100, 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$  for the RP-LC methods, equivalent to 80, 100 and 120% of the working concentration solutions, respectively. Accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation; it was expressed as the percentage relative error (bias %).

#### **2.5.4 Limit of detection and limit of quantitation**

The LOD and the LOQ were calculated as defined by ICH [22], using the mean values of three independent analytical curves, determined by a linear-regression model, where the factors 3.3 and 10 for the LOD and LOQ, respectively, were multiplied by the ratio of the standard deviation of the intercept and the slope. The LOQ was also evaluated in an experimental assay.

#### **2.5.5 Robustness**

The robustness of the SE-LC and RP-LC methods was determined by analyzing the same samples containing (50 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), respectively, under one-variable-at-a-time (OVAT) conditions: mobile phase pH, mobile phase concentration, flow rate ( $\text{mL min}^{-1}$ ), column temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) and wavelength (nm). Additionally, the robustness parameters were also evaluated and compared by the multi-variable-at-a-time (MVAT), using an experimental design. The procedure selected was a two-level (i.e.,  $2^{4-1}$  or eight experiments), fractional factorial design performed by the selection of four factors: phosphate buffer pH or TFA (%), flow rate ( $\text{mL min}^{-1}$ ), column temperature ( $^{\circ}\text{C}$ ) and wavelength (nm) respectively, for SE-LC, and for RP-LC. The factors and their high and low levels were evaluated as presented in Table 1. The obtained responses were processed by Minitab 14 statistical software to assess the significance of the effects, represented by the Pareto charts, that consists of bars with a length proportional to the absolute value of the estimated effect, divided by the pseudo standard error (PSE) defined by Lenth [24]. The chart includes a vertical line

at the critical t-value ( $\alpha = 0.05$ ), and smaller effects are considered non-significant. To assess the stability of the DmAb samples, analysis was performed after their storage at 2 – 8 °C for 24 and 48 h, and also placed into the auto sampler for 24 h, at room temperature. To study the stability of these solutions, the experiment was run and any changes in the chromatographic pattern as compared with the freshly prepared solutions were recorded.

#### **2.5.6 System Suitability Test**

A system suitability test was also carried out to evaluate the repeatability of both the SE-LC and RP-LC methods. Five replicate injections of 50  $\mu\text{L}$  of BS-DmAb solutions, containing 50 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively, were used. The peak area, retention time, tailing factor (peak symmetry) and theoretical plates were recorded using LC Solution version 1.22 SP1 software program.

### **2.6 Analysis of DmAb in biopharmaceutical formulations**

To quantitate DmAb in biopharmaceutical products by the LC methods, samples available for clinical use were diluted to appropriate concentration in ultrapure water. The samples were injected in triplicate, and the percentage recoveries were calculated against BS-DmAb.

## **3 RESULTS AND DISCUSSION**

### **3.1 Development and optimization of chromatographic conditions**

To develop the LC methods, tests were carried out to determine which mobile phase and column would lead to satisfactory selectivity and sensitivity within a short separation time. For the SE-LC method, some mobile phases containing potassium phosphate, sodium phosphate and phosphoric acid were tested. Potassium phosphate buffer with sodium chloride resulted in higher sensitivity and better retention time. The influence of the concentration of sodium chloride was evaluated from 50 – 200 mM, where higher concentrations demonstrated a significant effect on the peak shape, and then the 200 mM was selected. Mobile phase pH was investigated from 2.5 – 7.5 and the best performance was achieved at pH 7.4. The effects of organic modifiers, methanol and isopropanol, in the concentration range of 5 – 10% v/v, were also evaluated, but no improvement on the chromatographic profile was achieved. For the RP-LC method, mobile phases containing 0.1% v/v

TFA in water, and 0.1% v/v TFA in acetonitrile or in a mixture of isopropanol, acetonitrile, water (70+20+9.9 v/v) were tested. The best peak shape was obtained using as mobile phase 0.1% v/v TFA in water and 0.1% v/v TFA in acetonitrile. In addition, the Vydac 214TP C<sub>4</sub> column (250 mm × 4.6 mm i.d., with a particle size of 5 μm and pore size of 300 Å) and Kinetex EVO C<sub>18</sub> column (150 mm × 4.6 mm i.d., with a particle size of 5 μm and pore size of 100 Å) were tested based on their separation compatibilities with high temperature conditions, and the Vydac C<sub>4</sub> column was selected. The temperature of the column was maintained at 60 °C, since it showed a significant impact on peak elution and symmetry. For the selection of the best detection wavelength, a PDA detector was used. The optimized conditions for the SE-LC and RP-LC methods were used to obtain the typical chromatograms, demonstrating the peaks corresponding to DmAb with retention times of 7.6 min and 18.2 min, as shown in Figures 1 (a, b) and 2 (a, b).

### **3.2 Methods validation**

#### **3.2.1 Specificity**

The specificity of the SE-LC method for the biological product was evaluated by neutral hydrolysis, showing reduction of 43% of the monomer peak area, detected at 7.6 min, and two additional peaks that appeared with retention times at 5.4 and 6.7 min (Figure 1 c). These additional peaks can be attributed probably to higher molecular weight (HMW) species of the protein. Specificity of the RP-LC method was evaluated under photolytic and oxidative conditions. The forced photolytic condition resulted in 35% reduction of the main peak area, and one additional peak at 17.0 min (Figure 2 c). The forced oxidative degradation showed reduction of approximately 28% of the main peak area, one peak related to the hydrogen peroxide at 3.0 min, and one additional peak at 17.4 min, as shown in Figure 2 (d). These additional peaks can be attributed probably to related proteins of the DmAb. Then, the specificity of LC methods was also established by determining the peaks purity of the DmAb by overlaying the spectra captured at the apex, upslope, and downslope with a PDA detector. Together with the peak purity index in the range of 0.9999–1, the data showed that the peaks were free of any co-eluting peak, and that the excipients did not interfere in the analysis, which confirmed that the proposed LC methods were specific for the analysis of DmAb.

### 3.2.2 Linearity

For the SE-LC method, calibration curves for DmAb were found to be linear over the range of 5 – 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The value of the determination coefficient was calculated as  $r^2 = 0.9993$ ,  $y = (58738 \pm 2451.55) x - (47086 \pm 35550.74)$ , where  $x$  is concentration and  $y$  is the peak absolute area, indicated the linearity of the analytical curve for the method. Equally, for the RP-LC method, the analytical curves were found to be linear over the range of 5 – 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The value of the determination coefficient was calculated as  $r^2 = 0.9997$ ,  $y = (49574 \pm 1004.19) x - (136183 \pm 29097.25)$ , indicating the linearity of the analytical curve for the method.

### 3.2.3 Precision

The precision of the SE-LC and RP-LC methods was studied by calculating the relative standard deviation (RSD %) for six analyses at a concentration of 50 and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively, performed on the same day and under the same experimental conditions. The obtained RSD values were 0.02 and 0.01%. To assess the intermediate precision, two samples were analyzed on three different days (inter-days), giving RSD values of 0.74 and 0.95%, respectively for the SE-LC, and 0.55 and 0.56%, for the RP-LC methods. Between-analysts precision was determined by calculating the mean values and the RSD after analysis of two samples by two analysts; the mean values were found to be 1.75 and 0.17%, respectively, for the SE-LC and 1.08 and 0.17%, for the RP-LC methods.

### 3.2.4 Accuracy

Accuracy of the SE-LC method was assessed from three replicate determinations of three solutions containing either 40, 50 and 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . In addition, the accuracy of the RP-LC method was assessed from three replicate determinations of three solutions containing either 80, 100 and 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively. The absolute means obtained with a mean value of 100.53 and 100.80% and a bias lower than 0.84 and 1.25% (Table 2), respectively, proved that the methods are accurate within the desired range.

### 3.2.5 Limit of detection and limit of quantitation

The LOD and LOQ of the LC methods were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept determined by a linear-regression line by using the



mean values of the three independent calibration curves. The obtained values were 1.83 and 5.54  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , for the SE-LC and 1.94 and 5.87  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , for the RP-LC. The evaluated experimental LOQ with a precision lower than 5% and accuracy within  $\pm 5\%$  [25], was found to be 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , for both methods, suitable for the quality control analysis of biopharmaceutical formulations.

### 3.2.6 Robustness

The results and the experimental range of the selected variables evaluated by OVAT approach are given in Tables 3 and 4, together with the optimized values, demonstrating that they are within the acceptable deviation ( $\text{RSD} \leq 2\%$ ), with non-significant differences ( $p > 0.05$ ), as calculated by analysis of the variance. In addition, the robustness of the LC methods was assessed by the MVAT approach and the significance of the effects was evaluated by the Pareto chart. The parameters are described in Figure 3, and the combination of two codes indicates the effect of the interaction between the variables. The bars are drawn and ranked according to the strength of the effects, with the largest on the top, showing that they are statistically non-significant ( $\alpha > 0.05$ ). Therefore, the LC methods can be considered robust under the conditions tested. The stability of sample solutions was assessed, and the data showed the stability for 24 h in auto-sampler and for 48 h when maintained at 2 – 8 °C.

### 3.2.7 System Suitability

A system suitability test was performed and RSD values obtained for the peak area, retention time and peak symmetry were 0.67, 0.38 and 0.34%, respectively for the SE-LC and 0.18, 0.98 and 1.10%, for the RP-LC methods. The number of theoretical plates was about 3424.73 with a RSD of 1.25% and 20946.63, with a RSD of 1.78%, respectively. The parameters tested here were within an acceptable range ( $\text{RSD} < 2\%$ ).

## 3.3 Application of the methods

The validated methods were applied to the determination of DmAb in biopharmaceutical formulations, giving mean values 0.99 and 0.49% higher for the SE-LC and RP-LC, respectively, compared to the bioassay, with non-significant differences ( $p > 0.05$ ) (Table 5). The correlation between the LC methods and the

bioassay was calculated by the Pearson's coefficient, showing significant correlation for the SE-LC ( $r = 0.9273$ ) and for the RP-LC ( $r = 0.9046$ ). In addition, samples subjected to the neutral hydrolysis, photolytic and oxidative conditions, described under the specificity, were analyzed by the LC methods, showing significant degradations ( $p < 0.05$ ) (Table 5). The biological activities of the samples degraded containing HMW forms or related proteins ( $4^c$  and  $4^d$ ) were reduced by 13.60 and 25.40%, respectively, excluding the oxidative condition due to the interference of  $H_2O_2$ . The same samples were also subjected to cytotoxicity tests on the NCTC Clone 929 cell line (mammalian fibroblasts, ATCC® CCL-1™), giving non-significant results (data not shown). The results show the capability of each method, and that the combination may represent an improvement, in attempts to develop alternative assays.

#### 4 CONCLUSIONS

The results of the validation studies showed that SE-LC and RP-LC methods are specific and sensitive, with significant correlation, as compared to those of the bioassay. The LC methods represent a great improvement that can be applied in combination with the bioassay, during the biotechnology process, to monitor the stability, improve quality control, and to ensure the batch-to-batch consistency of bulk and finished biotechnology-derived medicine.

#### 5 ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Brazilian Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (Capes), for financial support.

#### 6 REFERENCES

- [1] BREEDVELD, F. C. Therapeutic monoclonal antibodies. **The Lancet**, v. 355, n. 9205, p. 735–740, 2000.
- [2] HANLEY, D. A. et al. Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes. **International Journal of Clinical Practice**, v. 66, n. 12, p. 1139–1146, 2012.
- [3] CUMMINGS, S. R. et al. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 8, p. 756–765, 2009.

- [4] RACHNER, T. D.; KHOSLA, S.; HOFBAUER, L. C. Osteoporosis: now and the future. **The Lancet**, v. 377, n. 9773, p. 1276–1287, 2011.
- [5] BRANSTETTER, D. G. et al. Denosumab induces tumor reduction and bone formation in patients with giant-cell tumor of bone. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 16, p. 4415–4424, 2012.
- [6] LACEY, D. L. et al. Bench to bedside: elucidation of the OPG–RANK–RANKL pathway and the development of denosumab. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 5, p. 401–419, 2012.
- [7] EMA – European Medicines Agency. CHMP assessment report for Prolia. 2010.
- [8] GREEN, W. Denosumab (Prolia) Injection: a new approach to the treatment of women with postmenopausal osteoporosis. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 35, n. 10, p. 553–559, 2010.
- [9] KOSTENUK, P. J. et al. Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 24, n. 2, p. 182–195, 2009.
- [10] TYAGI, A. K. et al. Calebin A downregulates osteoclastogenesis through suppression of RANKL signaling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 593, p. 80–89, 2016.
- [11] CHIRINO, A. J.; MIRE-SLUIJ, A. Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1383–1391, 2004.
- [12] FEKETE, S. et al. Analytical strategies for the characterization of therapeutic monoclonal antibodies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 42, p. 74–83, 2013.
- [13] ZHANG, T. Y. et al. HPLC for characterization and quality control of therapeutic monoclonal antibodies. **LCGC North America**, v. 10, n. 10, p. 796–808, 2014.
- [14] DAMEN, C. W. N. et al. The bioanalysis of the monoclonal antibody trastuzumab by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after immuno-affinity purification from human serum. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n. 5, p. 861–866, 2009.
- [15] LIU, H.; GAZA-BULSECO, G.; CHUMSAE, C. Analysis of reduced monoclonal antibodies using size exclusion chromatography coupled with mass

- spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, n. 12, p. 2258–2264, 2009.
- [16] NAVAS, N. et al. Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP) HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 29, p. 9351–9363, 2013.
- [17] MARTÍNEZ-ORTEGA, A. et al. Study and ICH validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the quantification of the intact monoclonal antibody cetuximab. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 117–124, 2016.
- [18] The United States Pharmacopeia (USP 39), 2016, Rockville: The United States Pharmacopeial Convention.
- [19] HONG, P. et al. A review size-exclusion chromatography for the analysis of protein biotherapeutics and their aggregates. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 35, n. 20, p. 2923–2950, 2012.
- [20] STAMM, F. P. et al. Assessment of recombinant human parathyroid hormone: correlation of LC methods with bioassays. **Analyst**, v. 138, n. 5, p. 1419–1426, 2013.
- [21] WU, H. et al. Competing aggregation pathways for monoclonal antibodies. **FEBS Letters**, v. 588, n. 6, p. 936–941, 2014.
- [22] ICH – International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Guideline on Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2(R1), 2005.
- [23] FDA – Food and Drug Administration. Guidance for industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics (2015).
- [24] LENTH, R. V. Quick and easy analysis of unreplicated factorials. **Technometrics**, v. 31, n. 4, p. 469–473, 1989.
- [25] SHABIR, G. A. et al. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n. 3, p. 311–333, 2007.

**Table 1.** Variables selected as factors and levels investigated during the robustness testing by the multi-variable-at-a-time procedure for the LC methods.

Method	Factor	Optimal	Low level	High level
SE-LC	phosphate buffer pH	7.4	7.2	7.6
	flow (mL min <sup>-1</sup> )	1.0	0.9	1.1
	column temperature (°C)	25	23	27
	wavelength (nm)	214	212	216
RP-LC	TFA (%)	0.1	0.09	0.11
	flow (mL min <sup>-1</sup> )	1.0	0.9	1.1
	column temperature (°C)	60	58	62
	wavelength (nm)	214	212	216

**Table 2.** Accuracy of SE-LC and RP-LC for DmAb in the biopharmaceutical formulations.

Method	Nominal concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Mean concentration measured <sup>a</sup> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	RSD <sup>b</sup> (%)	Accuracy <sup>a</sup> (%)	Bias <sup>c</sup> (%)
SE-LC	40	40.13	0.21	100.33	0.33
	50	50.42	1.40	100.84	0.84
	60	60.26	0.62	100.43	0.43
RP-LC	80	81.00	0.86	101.25	1.25
	100	100.29	0.56	100.29	0.29
	120	121.02	0.43	100.85	0.85

<sup>a</sup> = Mean of three replicates. <sup>b</sup> = RSD, Relative standard deviation ; <sup>c</sup> = Bias = [(Measured concentration - Nominal concentration)/Nominal concentration] × 100.

**Table 3.** Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing by the one-variable-at-a-time procedure for the SE-LC method.

Variable	Range investigated	DmAb <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	Optimized value
Mobile phase pH	7.3	100.32	1.33	7.4
	7.4	101.04	0.57	
	7.5	101.01	0.63	
Sodium chloride concentration (mM)	190	101.56	1.10	200
	200	101.33	0.20	
	210	99.97	0.74	
Column temperature (°C)	24	101.44	0.14	25
	25	100.35	0.13	
	26	101.27	0.36	
Wavelength (nm)	210 – 320	–	–	214
Solution stability	Autosampler, 24 h	99.86	0.78	–
	2 – 8 °C, 24 h	100.35	1.32	–
	2 – 8 °C, 48 h	99.12	0.11	–

<sup>a</sup> = Mean of three replicates. <sup>b</sup> = RSD, Relative standard deviation.

**Table 4.** Chromatographic conditions and range investigated during robustness testing by the one-variable-at-a-time for the RP-LC method.

Variable	Range investigated	DmAb <sup>a</sup> (%)	RSD <sup>b</sup> (%)	Optimized value
Acetonitrile (%)	39	99.34	0.21	40
	40	99.43	0.20	
	41	99.33	0.24	
Flow rate (mL min <sup>-1</sup> )	0.9	99.61	0.48	1.0
	1.0	99.23	0.16	
	1.1	99.09	0.18	
Column temperature (°C)	58	99.13	0.30	60
	59	99.26	0.21	
	60	99.08	0.15	
Wavelength (nm)	210 – 300	–	–	214
Solution stability	Autosampler, 24 h	99.43	0.08	–
	2 – 8 °C, 24 h	99.41	0.28	–
	2 – 8 °C, 48 h	99.25	0.22	–

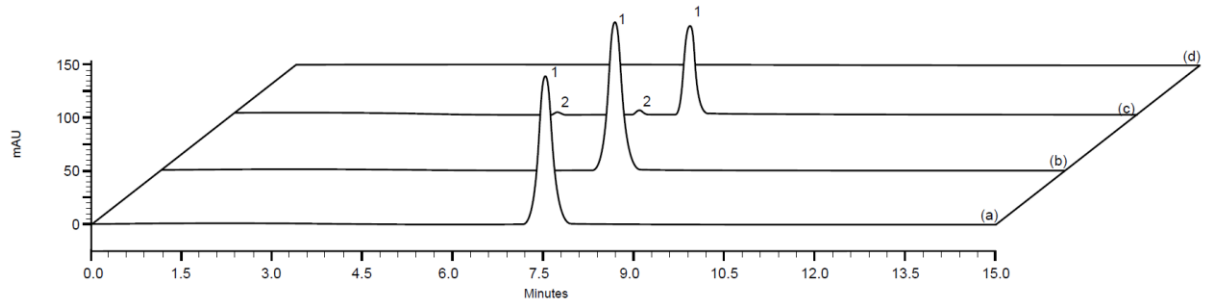
<sup>a</sup>= Mean of three replicates. <sup>b</sup>= RSD, Relative standard deviation.



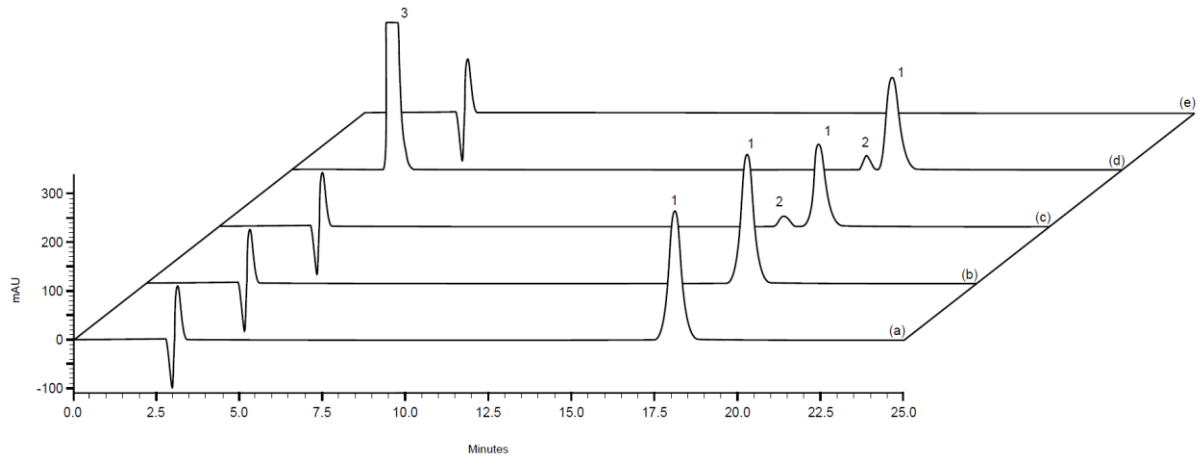
**Table 5.** Comparative quantitation of DmAb in biopharmaceutical formulations, by the LC methods and the osteoclastogenesis antiproliferative bioassay.

Sample	Theoretical amount (mg mL <sup>-1</sup> )	SE-LC <sup>a</sup>		RP-LC <sup>a</sup>		Bioassay <sup>a</sup>	
		Monomer (%)	HMW (%)	Main peak (%)	Related proteins (%)	Potency (%)	Confidence intervals ( <i>p</i> = 0.95)
1	60	98.77	0.41	98.80	0.06	97.10	89.80 – 104.80
2	60	100.22	0.20	99.56	0.04	99.90	90.40 – 110.50
3	60	99.90	0.27	99.35	0.06	100.40	95.70 – 105.40
4	60	100.37	0.40	99.53	0.02	98.90	92.20 – 106.20
5	60	97.14	0.29	96.65	0.50	95.10	87.50 – 103.40
Mean	–	99.28	0.31	98.78	0.14	98.29	–
SD <sup>b</sup>	–	1.35	0.09	1.23	0.20	2.18	–
					ANOVA	F calculated	
					Between-methods	0.46	
4 <sup>c</sup>	–	57.22	1.11	–	–	85.30	78.50 – 92.60
4 <sup>d</sup>	–	–	–	62.86	2.41	73.50	64.60 – 83.50
4 <sup>e</sup>	–	–	–	73.12	9.88	Nt <sup>f</sup>	–

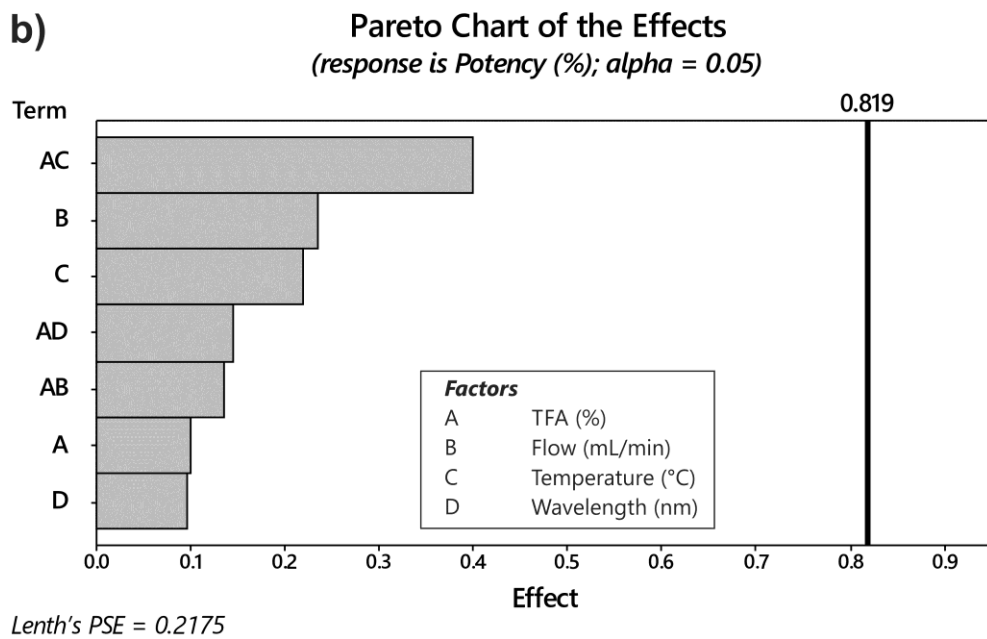
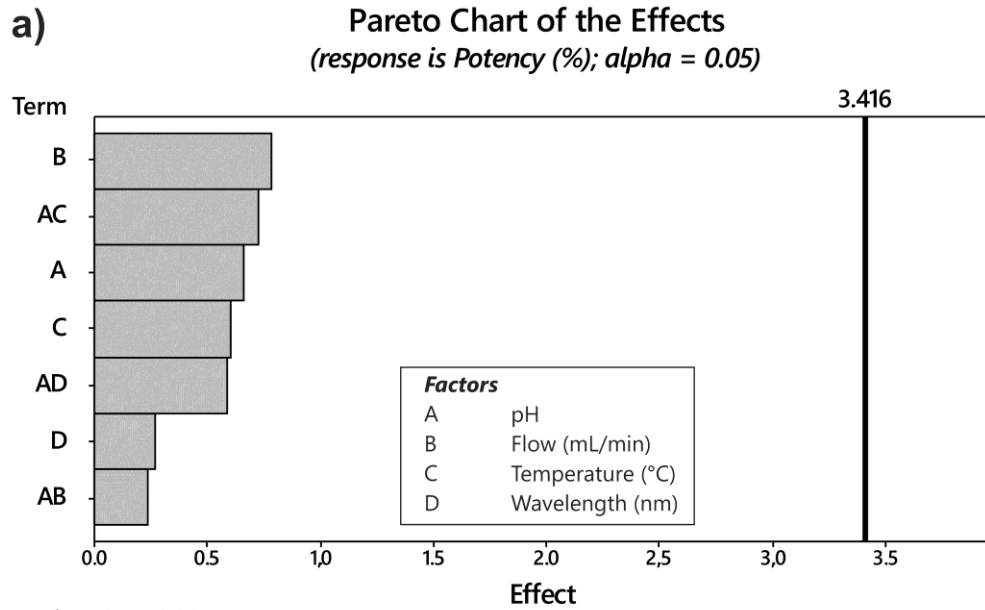
<sup>a</sup> = Mean of three replicates. <sup>b</sup> = SD, Standard deviation. Content of altered samples: <sup>c</sup> = neutral hydrolysis; <sup>d</sup> = UV degradation; <sup>e</sup> = oxidative degradation. <sup>f</sup> = Nt, Not tested.



**Figure 1.** Representative SE-LC chromatograms showing peak 1 = denosumab; peak 2 = high molecular weight proteins. (a) Representative biological reference substance of denosumab; (b) Sample of biopharmaceutical formulation, and after (c) neutral hydrolysis; (d) Placebo.



**Figure 2.** Representative RP-LC chromatograms showing peak 1 = denosumab, peak 2 = related proteins and peak 3 = hydrogen peroxide. (a) Representative biological reference substance of Denosumab; (b) Sample of biopharmaceutical formulation, and after (c) forced photolytic degradation; (d) forced oxidative degradation; (e) Placebo.



**Figure 3.** Pareto charts representing the effects of the variables and their interactions investigated during the robustness testing for the determination of DmAb by: (a) SE-LC and (b) RP-LC methods.

## DISCUSSÃO

---

## 4 DISCUSSÃO

---

O domínio das técnicas de engenharia genética, aplicadas para o desenvolvimento e produção dos mAbs, viabilizou avanços importantes na área farmacêutica, como o uso desses produtos biotecnológicos para o tratamento de doenças (JIANG et al., 2011). Neste contexto, destaca-se a necessidade de métodos analíticos para sua completa caracterização e avaliação, assegurando a qualidade nas diferentes etapas dos processos de produção e dos produtos acabados (CHIRINO; MIRE-SLUIS, 2004; WHO, 2013).

Especialmente para o DmAb, sobre o qual não existem especificações farmacopeicas, encontram-se também poucas publicações sobre procedimentos analíticos. Deste modo, foram planejados os estudos para desenvolvimento e validação de métodos por CL-EM e por CL-FR para caracterização, identificação e quantificação nos produtos biotecnológicos. Além disso, foi desenvolvido bioensaio por cultura de células *in vitro* para avaliação da sua atividade biológica e estudos de correlação.

A presente discussão fundamenta-se no artigo científico incluído no capítulo anterior, no qual estão detalhados os resultados experimentais encontrados.

Convém detalhar que não existe Padrão Internacional para o DmAb. Paralelamente, há dificuldades para obtenção da substância ativa pura junto a fornecedores qualificados. Deste modo, optou-se pela aquisição do outro produto comercial de DmAb, patenteado pela Indústria Farmacêutica produtora (Xgeva<sup>®</sup> 120mg/1,7mL), que foi adotado como Substância Biológica de Referência representativa (BS-DmAb) para as pesquisas. Procedimento semelhante tem sido aplicado em trabalhos descritos na literatura internacional (NAVAS et al., 2013; MARTÍNEZ-ORTEGA et al., 2016).

Inicialmente, desenvolveu-se o método por CL-EM testando fases móveis compostas por tampão fosfato e cloreto de sódio em diferentes concentrações e ácido fosfórico. O cloreto de sódio tem capacidade de aumentar a força iônica do tampão, razão pela qual foi avaliado nas concentrações entre 50 a 200 mM. Além disso, foram testadas as colunas cromatográficas BioSep SEC-s2000 (300 mm × 7,8 mm d.i., 8 µm), TSKgel G2000<sub>sw</sub> (300 mm × 7,8 mm d.i., 5 µm) e YARRA SEC-2000 (300 mm × 7,8 mm d.i., 3 µm). Observaram-se as recomendações sobre as condições de uso da coluna selecionada e a fase móvel foi então testada na faixa

de pH de 2,5 a 7,5. Avaliou-se também a interferência dos modificadores orgânicos metanol e isopropanol (5 a 10% v/v). Optou-se pela escolha das condições cromatográficas com base na simetria e no tempo de retenção do pico do DmAb. A separação foi alcançada com tempo de retenção de 7,6 min e o tempo de corrida foi de 15,0 min (Figura 1), condições adequadas para avançar para a validação.

A especificidade do método foi avaliada por estudos de degradação forçada por aquecimento e agitação, análise dos excipientes da formulação e determinação da pureza dos picos. Após degradação da amostra, a geração de picos adicionais além do relativo ao DmAb, detectados nos tempos de 5,4 e 6,7 min, pode ser atribuída provavelmente a proteínas de alta massa molecular. Não foram detectados picos relativos aos excipientes, demonstrando que não interferem na identificação e quantificação do DmAb. A pureza dos picos, tanto do monômero como dos picos adicionais, foi avaliada por detector de arranjo de diodos (DAD), que demonstrou elevada pureza ( $> 0,9999$ ) e indicou que não houve co-eluição de produtos de degradação com o pico do DmAb nas condições selecionadas. Portanto, os resultados observados confirmam a especificidade do método proposto.

Além disso, o método apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 5 – 200  $\mu\text{g/mL}$ , com coeficiente de determinação ( $r^2$ ) = 0,9993. A precisão foi avaliada em dois níveis, repetibilidade e precisão intermediária (inter-dias e inter-analistas), e os dados obtidos forneceram coeficientes de variação (CV) inferiores a 1,75%. Os resultados confirmam a precisão do método, visto que a literatura preconiza valores  $\leq 2\%$  para produtos biotecnológicos (SHABIR, 2003; ICH, 2005; FDA, 2015). Os valores experimentais obtidos para a exatidão forneceram média de 100,53%, que confirmam a exatidão do método proposto, conforme mostrado na Tabela 2.

Por sua vez, a robustez do método foi estudada através de pequenas modificações independentes na concentração de cloreto de sódio (mM), no pH da fase móvel, na temperatura da coluna ( $^{\circ}\text{C}$ ) e no comprimento de onda (nm), observando que não houve influência na quantificação do DmAb. Os resultados variaram entre 99,12 e 101,56%, conforme demonstrado na Tabela 3. Além disso, executaram-se testes com planejamento experimental baseado na avaliação de quatro fatores em conjunto (pH e vazão da fase móvel, temperatura da coluna e comprimento de onda) em dois níveis (baixo e alto,  $\pm 1$ ). O gráfico de Pareto foi construído utilizando o software estatístico Minitab. Os resultados obtidos não

mostraram alterações significativas nos teores/potências, com nível de significância 5%, sendo inferiores ao valor crítico (3,416), conforme pode ser observado na Figura 3(a), que ilustra a robustez do método analítico. É importante destacar que a vazão da fase móvel foi a condição mais sensível a alterações e que o seu efeito apresentou maior magnitude de variação de teor em relação aos demais fatores. Os parâmetros do teste de adequabilidade do sistema (área, tempo de retenção, simetria e pratos teóricos) foram avaliados, observando-se que os resultados obtidos cumpriram com as especificações preconizadas, além de  $CV < 2\%$ , garantindo que as condições do método estavam adequadas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ICH, 2005; FDA, 2015; USP 39, 2016).

Paralelamente, avançou-se também para o desenvolvimento e validação do método por CL–FR. Foram testadas fases móveis compostas por ácido trifluoroacético (TFA) em água e TFA em acetonitrila ou em uma mistura de isopropanol, acetonitrila e água, e também tampão acetato de amônio e acetonitrila. Testaram-se as colunas Vydac 214TP C<sub>4</sub> e Kinetex EVO C<sub>18</sub>, nas temperaturas entre 40 e 60 °C, de acordo com as recomendações de uso, observando-se diferença significativa na eluição e simetria do pico do DmAb ao utilizar 60 °C. Deste modo, a separação cromatográfica foi obtida com tempo de retenção de 18,2 min e o tempo de corrida foi de 25,0 min (Figura 2).

Os estudos de degradação forçada, sob condições de estresse fotolítico e oxidativo resultaram na identificação de picos adicionais que podem ser atribuídos provavelmente, às proteínas relacionadas de DmAb, pois os mAbs são altamente suscetíveis a oxidação da metionina e reações químicas de desamidação (CHIRINO, MIRE-SLUIS, 2004). A análise de amostra preparada somente com os excipientes da formulação não apresentou nenhum pico e a pureza dos picos, avaliada com DAD, forneceu elevada pureza ( $> 0,9999$ ), indicando que não há co-eluição, confirmando a especificidade do método proposto.

O método apresentou regressão linear significativa na faixa de concentração de 5 – 300 µg/mL e  $r^2 = 0,9997$ . Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária forneceram  $CV \leq 1,08\%$  (SHABIR, 2003). Na Tabela 2 podem ser observados os valores experimentais obtidos no teste de exatidão, com média de 100,80%. Os resultados obtidos asseguram a precisão e exatidão do método proposto.



Na avaliação da robustez, demonstrou-se que não houve diferença significativa nos resultados de teores/potências, quando foram introduzidas variações independentes dos parâmetros % de acetonitrila, fluxo, temperatura da coluna e comprimento de onda (Tabela 4). O desenho experimental já descrito para o método analítico por CL-EM, foi novamente aplicado modificando quatro fatores em conjunto (% de TFA, vazão da fase móvel, temperatura da coluna e comprimento de onda), em dois níveis ( $\pm 1$ ). Os resultados demonstraram que não houve alteração significativa ( $\alpha > 0,05$ ) nas quantificações, pois os efeitos foram inferiores ao valor crítico (0,819), conforme demonstrado no gráfico de Pareto, Figura 3(b). É importante destacar que a combinação de % de TFA com a temperatura da coluna, foi a condição mais sensível a alterações, com maior magnitude de variação em relação aos demais fatores, porém não significativas. Os dados do teste da adequabilidade do sistema cromatográfico mostram que o equipamento e as condições do método são adequados para assegurar a confiabilidade dos resultados, estando de acordo com a literatura ( $CV \leq 2\%$ ) (ICH, 2005; FDA, 2015; USP 39, 2016).

Portanto, os parâmetros de validação estudados para os métodos físico-químicos, por CL-EM e CL-FR, demonstram que cumprem com os requisitos preconizados pelos compêndios oficiais (ICH, 2005; FDA, 2015; USP 39, 2016) e podem ser aplicados para quantificação do DmAb em produtos biotecnológicos acabados.

Além disso, foi também desenvolvido o ensaio biológico antiproliferativo da osteoclastogênese, por cultura de células *in vitro*, que foi adotado para a avaliação da atividade biológica do DmAb. A sensibilidade do ensaio foi aprimorada pelo tratamento das células com M-CSF, que induz a expressão do RANK na linhagem de macrófagos RAW 264,7. O tempo de incubação de 5 dias contribuiu para a diferenciação em células osteoclásticas, pela adição do RANKL, conforme descrito previamente (VINCENT et al., 2009; TYAGI et al., 2016). O ensaio foi executado com quatro doses de DmAb e a inibição da proliferação celular foi avaliada pela determinação das células viáveis com o corante azul de alamar e leitura espectrofotométrica.

Os resultados obtidos pela aplicação do bioensaio na quantificação do produto acabado de DmAb (Prolia<sup>®</sup>), foram correlacionados com aqueles fornecidos pelos métodos por CL-EM e CL-FR, apresentados na Tabela 5. Observa-se que os

métodos por CL–EM e CL–FR apresentaram teores/potências 0,99 e 0,49% superiores em relação ao bioensaio, respectivamente. A análise de variância ANOVA demonstrou não haver diferenças estatisticamente significativas entre os teores/potências fornecidos pelos métodos, com nível de significância de 5% ( $p = 0,05$ ). A correlação entre os métodos por CL–EM e CL–FR em relação ao bioensaio, foi calculada pelo coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ), que forneceu resultados  $r = 0,9273$  e  $0,9046$ , respectivamente, demonstrando a significância dos dados.

É importante destacar que a análise das amostras submetidas às condições forçadas de estresse, originaram a formação de produtos de degradação que foram detectados e quantificados pelos métodos por CL–EM e CL–FR. As análises são importantes para demonstrar possíveis alterações dos produtos, decorrentes de sua estabilidade. A Tabela 5 apresenta também os resultados da aplicação do bioensaio nas amostras degradadas, que demonstram a influência respectiva sobre a atividade biológica. Acrescenta-se que as amostras degradadas foram também submetidas a teste de citotoxicidade *in vitro*, não se detectando diferenças em relação à molécula íntegra (dados não mostrados). É importante frisar também que os guias oficiais preconizam para produtos biotecnológicos, teor/potência entre 90 a 110%, e estabelecem também limites para os produtos de degradação. Deste modo, os estudos constituem-se em contribuição no sentido de avaliar especificações que sejam adotadas para o DmAb (USP 39, 2016; EP, 2017).

Conforme descrito na revisão da literatura, observam-se publicações científicas de métodos analíticos por CL para análise de DmAb, com diferentes finalidades (ARTHUR et al., 2012; SWAMULU et al., 2012; ONAMI, et al., 2012). A validação do método por CL–FR por Swamulu e colaboradores (2012) não contempla todos os parâmetros recomendados pelo ICH, principalmente para especificidade/seletividade e robustez. Os autores não demonstram a capacidade do método para analisar/quantificar o DmAb na presença de substâncias que poderiam estar presentes na amostra, como excipientes e produtos de degradação, e não descrevem a substância de referência utilizada nas análises. Também não apresentam dados de testes da robustez, que assegurariam a reprodutibilidade e a capacidade do método para resistir a pequenas variações das condições analíticas, não sendo adequado para análises de rotina.

Neste contexto, o método por CL–FR desenvolvido e validado nesta dissertação contempla todos os parâmetros de validação recomendados pelos guias

internacionais (ICH, 2005; FDA, 2015) e apresenta vantagens em relação ao proposto por Swamulu e colaboradores (2012), pois permite a identificação/quantificação de DmAb, bem como de suas proteínas relacionadas. Além disso, demonstrou-se que os métodos por CL-EM e CL-FR podem ser adotados para quantificação do DmAb e de suas formas degradadas, nas etapas de expressão, purificação e para o produto acabado, em paralelo com o bioensaio por cultura de células *in vitro*, cuja validação se constitui em etapa sucessiva.

## **CONCLUSÕES**

---

## 5 CONCLUSÕES

---

- Desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida por exclusão molecular específico, preciso, exato e robusto, que forneceu resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para identificação, quantificação e avaliação de proteínas de alta massa molecular do anticorpo monoclonal denosumabe.
- Desenvolveu-se e validou-se método por cromatografia líquida em fase reversa específico, preciso, exato e robusto que forneceu resultados de acordo com parâmetros preconizados, que foi aplicado para avaliação do anticorpo monoclonal denosumabe e de suas proteínas relacionadas.
- Desenvolveu-se o bioensaio antiproliferativo da osteoclastogênese por cultura de células RAW 264,7 *in vitro* que foi adotado para avaliar a atividade biológica do denosumabe, demonstrando os efeitos das amostras degradadas.
- Avaliou-se os resultados fornecidos pelos métodos validados por CL–EM e CL–FR e pelo bioensaio por cultura de células *in vitro* para as amostras selecionadas, observando-se correlação significativa ( $p < 0,05$ ).
- Recomenda-se a aplicação dos métodos físico-químicos validados para avaliação de denosumabe, em combinação com o bioensaio por cultura de células *in vitro*, pois viabiliza a determinação de proteínas de alta massa molecular e de formas relacionadas, e representa contribuição importante para aprimorar a caracterização do produto biofarmacêutico.
- Os métodos desenvolvidos e validados no presente trabalho estabelecem bases para progressivos trabalhos científicos de correlação físico-química e biológica, contribuindo assim, para aprimorar o controle da qualidade e avanços na área de produtos biotecnológicos disponíveis e em pesquisa no País.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, B. E. et al. Reversed-phase high performance liquid chromatography as an alternative to animal bioassay for human thyrotropin potency determination. **Analytical Methods**, v. 6, n. 17, p. 6688–6694, 2014.
- AMGEN. **Prolia® (denosumab) Product Information**. 2015.
- AMGEN. **Prolia® (denosumab) Product Monograph**. 2016a.
- AMGEN. **XGEVA® (denosumab) Product Monograph**. 2016b.
- ARTHUR, K. K. et al. *In vitro* stoichiometry of complexes between the soluble RANK ligand and the monoclonal antibody denosumab. **Biochemistry**, v. 51, n. 3, p. 795–806, 2012.
- BARON, R. et al. Denosumab and bisphosphonates: different mechanisms of action and effects. **Bone**, v. 48, n. 4, p. 677–692, 2011.
- BOYCE, B. F. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 10, p. 860–867, 2013.
- BOYLE, W. J. et al. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337–342, 2003.
- BRANSTETTER, D. G. et al. Denosumab induces tumor reduction and bone formation in patients with giant-cell tumor of bone. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 16, p. 4415–4424, 2012.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 55, de 16 de Dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de dezembro de 2010.
- BRATS – Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. **Eficácia e segurança do uso de Bisfosfonatos por longo prazo para prevenção de fraturas osteoporóticas em mulheres na pós-menopausa**, v. 7, n. 21, p. 1–14, 2013.
- BREEDVELD, F. C. Therapeutic monoclonal antibodies. *The Lancet*, v. 355, n. 9205, p. 735–740, 2000.
- BUSS, N. A. P. S. et al. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, n. 5, p. 615–622, 2012.
- CARDOSO JR, C. D. A. et al. Analysis of streptokinase by validated LC methods and correlation with *in vitro* bioassay. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 2, p. 407–414, 2017.

CHIRINO, A. J.; MIRE-SLUIS, A. Characterizing biological products and assessing comparability following manufacturing changes. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1383–1391, 2004.

COMPSTON, J. et al. UK clinical guideline for the prevention and treatment of osteoporosis. **Archives of Osteoporosis**, v. 12, n. 1, p. 1–24, 2017.

COSMAN, F. et al. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 25, n. 10, p. 2359–2381, 2014.

CRUZ, P. I. N. **Papel do Denosumab no Tratamento da Doença Óssea Metastática**. 2011. 153 p. Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Universidade do Porto, Porto, 2011.

CUMMINGS, S. R. et al. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 8, p. 756–765, 2009.

DrugBank. Disponível em: < <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06643> > Acesso em: 10 jul. 2017.

ECKER, D. M. et al. The therapeutic monoclonal antibody market. **MAbs**, v. 7, n. 1, p. 9–14, 2015.

EMA, European Medicines Agency: **Europe Guideline on development, production, characterization and specifications for monoclonal antibodies and related products**. 2016.

EMA, European Medicines Agency: **Guideline on immunogenicity assessment of monoclonal antibodies intended for in-vivo clinical use**. 2012.

EUROPEAN Pharmacopoeia, 9<sup>th</sup> ed., Strasbourg: **Council of Europe**, 2017.

FDA, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics**. July 2015.

FEKETE, S. et al. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 101, p. 161–173, 2014.

FEKETE, S. et al. New trends in reversed-phase liquid chromatographic separations of therapeutic peptides and proteins: theory and applications. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 69, p. 9–27, 2012.

FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–17, 2015.

HANLEY, D. A. et al. Denosumab: mechanism of action and clinical outcomes. **International Journal of Clinical Practice**, v. 66, n. 12, p. 1139–1146, 2012.



HARADA, S.; RODAN, G. A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 349–355, 2003.

HELAS, S. et al. Inhibition of receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand by denosumab attenuates vascular calcium deposition in mice. **The American Journal of Pathology**, v. 175, n. 2, p. 473–478, 2009.

HLAING, T. T.; COMPSTON, J. E. Biochemical markers of bone turnover—uses and limitations. **Annals of Clinical Biochemistry: An International Journal of Biochemistry and Laboratory Medicine**, v. 51, n. 2, p. 189–202, 2014.

HOFBAUER, L. C. et al. Prevention of glucocorticoid-induced bone loss in mice by inhibition of RANKL. **Arthritis & Rheumatology**, v. 60, n. 5, p. 1427–1437, 2009.

ICH, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Guideline on Validation of Analytical Procedure: Text and Methodology Q2(R1)**. November 2005.

ICH, International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: **Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products**. March 1999.

IKEDA, K.; TAKESHITA, S. Factors and mechanisms involved in the coupling from bone resorption to formation: how osteoclasts talk to osteoblasts. **Journal of bone metabolism**, v. 21, n. 3, p. 163–167, 2014.

JIANG, X. et al. Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 2, p. 101–111, 2011.

KIM, J. H.; KIM, N. Regulation of NFATc1 in osteoclast differentiation. **Journal of Bone Metabolism**, v. 21, n. 4, p. 233–241, 2014.

KOSTENUIK, P. J. et al. Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 24, n. 2, p. 182–195, 2009.

LACEY, D. L. et al. Bench to bedside: elucidation of the OPG–RANK–RANKL pathway and the development of denosumab. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 5, p. 401–419, 2012.

LEWIECKI, E. M. Treatment of osteoporosis with denosumab. **Maturitas**, v. 66, n. 2, p. 182–186, 2010.

LIU, H. et al. Analysis of reduced monoclonal antibodies using size exclusion chromatography coupled with mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, n. 12, p. 2258–2264, 2009.

MANNING, M. C. et al. Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 4, p. 544–575, 2010.

MARTÍNEZ-ORTEGA, A. et al. Study and ICH validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the quantification of the intact monoclonal antibody cetuximab. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 117–124, 2016.

MILLER, P. D. Denosumab: anti-RANKL antibody. **Current Osteoporosis Reports**, v. 7, n. 1, p. 18–22, 2009.

MOEN, M. D.; KEAM, S. J. Denosumab. **Drugs & aging**, v. 28, n. 1, p. 63–82, 2011.

NAVAS, N. et al. Quantification of an intact monoclonal antibody, rituximab, by (RP) HPLC/DAD in compliance with ICH guidelines. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 29, p. 9351–9363, 2013.

NELSON, A. L. et al. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 10, p. 767–774, 2010.

ONAMI, I. et al. A versatile method for protein-based antigen bioanalysis in non-clinical pharmacokinetics studies of a human monoclonal antibody drug by an immunoaffinity liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1334, p. 64–71, 2014.

PIETSCHMANN, P. et al. Immunology of osteoporosis: a mini-review. **Gerontology**, v. 62, n. 2, p. 128–137, 2016.

PINEDA, C. et al. Assessing the immunogenicity of biopharmaceuticals. **BioDrugs**, v. 30, n. 3, p. 195–206, 2016.

RACHNER, T. D. et al. Osteoporosis: now and the future. **The Lancet**, v. 377, n. 9773, p. 1276–1287, 2011.

RAGGATT, L. J.; PARTRIDGE, N. C. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25103–25108, 2010.

REA, J. C. et al. Monoclonal antibody development and physicochemical characterization by high performance ion exchange chromatography. **Innovations in Biotechnology**, p. 440–464, 2012.

RIZZOLI, R. et al. Denosumab. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 8, p. 591–592, 2010.

ROBERTS, C. J. Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design, and control. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 372–380, 2014.

ROZET, E. et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1-2, p. 111–125, 2007.

SÀNCHEZ-RIERA, L. et al. Osteoporosis and fragility fractures. **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v. 24, n. 6, p. 793–810, 2010.

SCHNUERIGER, A. et al. Development of a quantitative, cell-line based assay to measure ADCC activity mediated by therapeutic antibodies. **Molecular Immunology**, v. 48, n. 12, p. 1512–1517, 2011.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, n. 1/2, p. 57–66, 2003.

SHABIR, G. A. et al. Evaluation and Application of Best Practice in Analytical Method Validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, n. 3, p. 311–333, 2007.

SOUTO, R. B. **Estudos analíticos para caracterização e avaliação de interleucina-11 humana recombinante**. 2015. 80 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2015.

STAMM, F. P. **Estudo de metodologias para avaliação do hormônio da paratireoide humano recombinante**. 2013. 52 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2013.

SUTJANDRA, L. et al. Population pharmacokinetic meta-analysis of denosumab in healthy subjects and postmenopausal women with osteopenia or osteoporosis. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 50, n. 12, p. 793–807, 2011.

SWAMULU, K. et al. Validated RP-HPLC Method for the Estimation of Denosumab in Formulation. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 66–73, 2012.

TYAGI, A. K. et al. Calebin A downregulates osteoclastogenesis through suppression of RANKL signalling. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 593, p. 80–89, 2016.

UNITED STATES Pharmacopeia, 39 ed., Rockville: **The United States Pharmacopeia Convention**, 2016.

VÁZQUEZ-REY, M.; LANG, D. A. Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 7, p. 1494–1508, 2011.

VIEIRA, J. G. H. Diagnóstico laboratorial e monitoramento das doenças osteometabólicas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 2, p. 75–82, 2007.

VINCENT, C. et al. The generation of osteoclasts from RAW 264.7 precursors in defined, serum-free conditions. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 27, n. 1, p. 114–119, 2009.

WANG, X. et al. Potential aggregation prone regions in biotherapeutics: A survey of commercial monoclonal antibodies. **MAbs**, v. 1, n. 3, p. 254–267, 2009.

WHO, World Health Organization: **Guidelines on the quality, safety, and efficacy of biotherapeutic protein products prepared by recombinant DNA technology**. Switzerland, 2013.

WU, H. et al. Competing aggregation pathways for monoclonal antibodies. **FEBS letters**, v. 588, n. 6, p. 936–941, 2014.

XINDU, G.; LILI, W. Liquid chromatography of recombinant proteins and protein drugs. **Journal of Chromatography B**, v. 866, n. 1/2, p. 133–153, 2008.

ZHANG, T. Y. et al. HPLC for characterization and quality control of therapeutic monoclonal antibodies. **LCGC North America**, v. 32, n. 10, p. 595–604, 2014.

**ANEXOS**

---

## ANEXO A – ESTRUTURA PRIMÁRIA PROPOSTA PARA AS CADEIAS PESADAS DO DENOSUMABE

1

E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M			
																																S				
G	K	V	S	D	A	Y	Y	T	S	G	G	S	G	G	T	I	G	S	V	W	E	L	G	G	K	G	P	A	Q	V	V	V	W			
R																																				
F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	D	P	G			
																																T				
S	P	A	L	P	F	V	S	P	G	K	T	S	A	S	S	V	T	V	L	T	G	Q	G	W	P	D	V	W	S	M	I	V	T			
S																																				
K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G			
																																V				
N	C	I	Y	T	Q	T	G	L	S	S	S	P	V	T	V	V	S	S	L	S	Y	L	G	S	S	Q	L	V	A	P	F	T	H			
V																																				
N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G			
																																G				
P	D	E	H	S	V	D	V	V	V	C	T	V	E	P	T	R	S	I	M	L	T	D	K	P	K	P	P	F	L	F	V	S	P			
E																																				
V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L			
																																T				
G	K	A	K	S	I	T	K	E	I	P	A	P	L	A	K	N	S	V	K	C	K	Y	I	K	G	N	L	W	D	Q	H	L	V			
Q																																				
P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	D	E	L	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D			
																																I				
Q	Q	W	R	S	K	D	V	S	G	D	S	D	L	V	P	P	T	T	K	Y	N	N	E	P	Q	G	N	S	E	W	E	V	A			
G																																				
N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G	K										

447

Onde:

A = alanina, R = arginina, N = asparagina, D = ácido aspártico, E = ácido glutâmico, C = cisteína, F = fenilalanina, Q = glutamina, G = glicina, H = histidina, I = isoleucina, L = leucina, K = lisina, M = metionina, P = prolina, S = serina, Y = tirosina, T = treonina, W = triptofano e V = valina.

Fonte: Adaptação de DrugBank.

## ANEXO B – ESTRUTURA PRIMÁRIA PROPOSTA PARA AS CADEIAS LEVES DO DENOSUMABE

1

E	I	V	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	R	G	R	Y	L
																												A					
G	S	G	S	G	S	F	R	D	P	I	G	T	A	R	S	S	A	G	Y	I	L	L	R	P	A	Q	G	P	K	Q	Q	Y	W
T																																	
D	F	T	L	T	I	S	R	L	E	P	E	D	F	A	V	F	Y	C	Q	Q	Y	G	S	S	P	R	T	F	G	Q	G	T	K
																												V					
N	N	L	L	C	V	V	S	A	T	G	S	K	L	Q	E	D	S	P	P	F	I	F	V	S	P	A	A	V	T	R	K	I	E
F																																	
Y	P	R	E	A	K	V	Q	W	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y
																												S					
S	K	T	V	P	S	S	L	G	Q	H	T	V	E	C	A	Y	V	K	H	K	E	Y	D	A	K	S	L	T	L	T	S	S	L
F																																	
N	R	G	E	C																													

215

Onde:

A = alanina, R = arginina, N = asparagina, D = ácido aspártico, E = ácido glutâmico, C = cisteína, F = fenilalanina, Q = glutamina, G = glicina, H = histidina, I = isoleucina, L = leucina, K = lisina, M = metionina, P = prolina, S = serina, Y = tirosina, T = treonina, W = triptofano e V = valina.

Fonte: Adaptação de DrugBank.