

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

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR ELETROFORESE
CAPILAR PARA AVALIAÇÃO DE FILGRASTIMA.
ESTUDOS DE CORRELAÇÃO ENTRE MÉTODOS
FÍSICO-QUÍMICOS E BIOLÓGICO.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Felipe Bianchini D'Avila

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR ELETROFORESE CAPILAR
PARA AVALIAÇÃO DE FILGRASTIMA. ESTUDOS DE
CORRELAÇÃO ENTRE MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS E
BIOLÓGICO.**

por

Felipe Bianchini D'Avila

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR ELETROFORESE CAPILAR PARA
AVALIAÇÃO DE FILGRASTIMA. ESTUDOS DE CORRELAÇÃO ENTRE
MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS E BIOLÓGICO.**

elaborada por
Felipe Bianchini D'Avila

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sérgio Luiz Dalmora, Dr.
(Presidente/Orientador)

Rui Oliveira Macedo, Dr. (UFPB)

Carlos Augusto Mallmann, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 24 de setembro de 2010.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, por me permitir chegar até aqui e tornar tudo possível.

Aos meus pais, Luiz Renato e Elizete e aos meus irmãos, Bruno e Diogo, pelo amor, educação, apoio e incentivo.

À Mariana, pelo amor, carinho, atenção e compreensão, fundamentais para a conclusão de mais uma etapa.

Ao Prof. Dr. Sérgio Luiz Dalmora, pelo apoio, amizade, confiança, orientação e revisão crítica.

Aos colegas de mestrado Diogo e Estevan, bolsistas e técnicos dos Laboratórios de Bioequivalência e Controle da Qualidade de Produtos Biológicos, pelo auxílio e amizade.

Aos colegas da faculdade de farmácia, pela amizade, companheirismo e apoio.

Aos professores, colegas e funcionários do Departamento de Farmácia Industrial.

À UFSM, que possibilitou a execução deste trabalho.

A todos que, mesmo não citados, contribuíram de alguma maneira para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR ELETROFORESE CAPILAR PARA AVALIAÇÃO DE FILGRASTIMA. ESTUDOS DE CORRELAÇÃO ENTRE MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS E BIOLÓGICO.

AUTOR: FELIPE BIANCHINI D'AVILA

ORIENTADOR: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 24 de setembro de 2010.

O fator estimulador da colônia de granulócitos humanos é uma citocina hematopoiética que estimula e regula a proliferação e diferenciação de células precursoras de neutrófilos da medula óssea. O hormônio recombinante (rhG-CSF) sob a forma não-glicosilada, filgrastima, é usado para o tratamento de neutropenia induzida por quimioterapia e transplante de medula óssea. A proteína hidrofóbica é constituída por uma cadeia de 175 aminoácidos com uma metionina N-terminal, e massa molecular de 18,8 kDa. No presente estudo, foi desenvolvido e validado método por eletroforese capilar de zona (CZE) para determinação de filgrastima em formulações farmacêuticas. As análises foram realizadas em capilar de sílica fundida (comprimento efetivo de 72 cm e diâmetro interno de 75 μm) e solução eletrolítica composta de tetraborato de sódio 50 mM, pH 9,0. O capilar foi mantido a temperatura de 15 °C, e a tensão aplicada foi de 15 kV. O tempo de injeção foi de 6 s, com pressão de 50 mbar, e detecção por arranjo de diodos (DAD) a 195 nm. A separação eletroforética foi obtida com tempo de migração de 21,8 e 15,8 minutos para filgrastima e acetato de leuprorrelina (padrão interno), respectivamente, e tempo total de corrida de 30 minutos. O procedimento foi validado, avaliando-se os parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de quantificação e limite de detecção. Demonstrou-se linearidade na faixa de concentração de 1 – 200 $\mu\text{g/mL}$ ($r^2 = 0,9978$) e limite de quantificação (LQ) de 1 $\mu\text{g/mL}$, com os demais parâmetros de validação aceitáveis. O método foi aplicado para análise de formulações farmacêuticas, e os resultados foram correlacionados com os obtidos por cromatografia líquida em fase reversa (CL-FR) e por exclusão molecular (CL-EM), e pelo bioensaio *in vitro*. Deste modo, os procedimentos pesquisados contribuem para o estabelecimento de alternativas que aprimoram o controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica do produto biológico.

Palavras-chave: Eletroforese capilar de zona (CZE), ensaio por cultura de células GNFS-60, cromatografia líquida, fator estimulador da colônia de granulócitos humanos recombinante, validação, filgrastima.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

VALIDATION OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHOD FOR THE EVALUATION OF FILGRASTIM. CORRELATION STUDY BETWEEN PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL METHODS.

AUTHOR: FELIPE BIANCHINI D'AVILA

ADVISER: SÉRGIO LUIZ DALMORA

Presentation date: Santa Maria, September 24th 2010.

The granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is a hematopoietic cytokine that stimulates and regulates the proliferation and differentiation of neutrophils precursors cells of the bone marrow. The recombinant hormone (rhG-CSF) non-glycosylated, filgrastim, is used to treat the neutropenia induced by chemotherapy and bone marrow transplantation. The hydrophobic protein is a 175 aminoacids chain which contains an extra methionine at its N-terminus, and molecular weight of 18.8 kDa. In the present study, a capillary zone electrophoresis (CZE) method was developed and validated for the analysis of filgrastim in pharmaceuticals. The analyses were performed on a fused-silica capillary (75 μm i.d.; effective length, 72 cm) and background electrolyte consisted of 50 mM sodium tetraborate solution at pH 9.0. The capillary temperature was maintained at 15 $^{\circ}\text{C}$ and the applied voltage was 15 kV. The injection was performed using the hydrodynamic mode at 50 mbar for 6 s, with detection at 195 nm using a PDA detector. The electrophoretic separation was obtained with migration time of 21.8 and 15.8 minutes for the filgrastim and leuprorrelin acetate (internal standard), respectively, and with run time of 30 minutes. The procedure was validated by the parameters of specificity, linearity, precision, accuracy, robustness, limit of quantitation and limit of detection. The method was linear in the concentration range of 1 – 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r^2 = 0.9978$) and the limit of quantitation (LOQ) was 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with acceptable validation parameters. The method was applied for the analysis of pharmaceutical formulations, and the results were correlated to the reversed-phase HPLC method (RP-HPLC), size-exclusion HPLC method (SE-HPLC) and *in vitro* bioassay method. Therefore, the procedures represent valid alternatives which can improve the quality control, assuring the safety and therapeutic efficacy of the biological product.

Keywords: Capillary zone electrophoresis; GNFS-60 cell culture assay; liquid chromatography; recombinant human granulocyte colony-stimulating factor; validation, filgrastim.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura primária da filgrastima recombinante (rhG-CSF). Proteína hidrofóbica constituída por uma cadeia polipeptídica com 175 aminoácidos, duas pontes dissulfeto, entre Cys^{36,42} e Cys^{64,74}, e massa molecular de 18,8 kDa..... 18

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

FIGURE 1 – Representative electropherogram of: (a) rhG-CSF pharmaceutical formulation (50 µg/mL) and rhG-CSF after degradation under: (b) acidic hydrolysis; (c) basic hydrolysis; (d) neutral heated hydrolysis; (e) oxidative condition. Peak 1: leuprorelin acetate (IS); 2 = rhG-CSF; 3 = degraded forms. 30

LISTA DE TABELAS

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

TABLE 1 – Inter-day and between-analysts precision data of CZE for rhG-CSF in samples of pharmaceutical formulations	31
TABLE 2 – Accuracy of CZE for rhG-CSF in samples of pharmaceutical formulations	31
TABLE 3 – CZE conditions and range investigated during robustness testing	31
TABLE 4 – Comparative content/potency evaluation of rhG-CSF in pharmaceutical formulations by electrophoretic, chromatographic methods and bioassay against the reference substance.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BP	Farmacopéia Britânica
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CHO	Células de ovário de hamster chinês
CL	Cromatografia líquida
CL-EM	Cromatografia líquida por exclusão molecular
CL-FR	Cromatografia líquida em fase reversa
CL-TI	Cromatografia líquida de troca iônica
CV	Coefficiente de variação
CV%	Coefficiente de variação percentual
CGE	Eletroforese capilar em gel
CZE	Eletroforese capilar de zona
Da	Dalton
DAD	Detector de arranjo de diodos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EC	Eletroforese capilar
DPR	Desvio padrão relativo
ELISA	Enzimaímunoensaio
EOF	Fluxo eletrosmótico
EMEA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
h	Hora
ICH	International Conference on Harmonisation
g	Grama
kV	Kilovolt
M	Molaridade
mbar	Milibar
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro

mM	Milimolar
m/z	Massa/carga
MUI	Milhões de unidades internacionais
<i>n</i>	Número de respostas
NIBSC	National Institute for Biological Standards and Control
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>P</i>	Significância estatística
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PEG	Polietilenoglicol
PI	Padrão interno
pI	Ponto isoelétrico
RSD	Relative Standard Deviation
r^2	Coefficiente de determinação
rhG-CSF	Fator estimulador da colônia de granulócitos humanos recombinante
rhGM-CSF	Fator estimulador da colônia de macrófagos humanos recombinante
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
UI	Unidades Internacionais
USP	Farmacopéia Americana
°C	Grau Celsius
μA	Microamper
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivos gerais	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
4 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA	26
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÕES.....	38
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os avanços na área de biotecnologia possibilitaram a produção de macromoléculas biológicas de interesse terapêutico, entre as quais destaca-se o fator estimulador da colônia de granulócitos humanos recombinante (rhG-CSF). O hG-CSF é uma citocina hematopoiética, produzida pelos macrófagos, células endoteliais e fibroblastos, que promove a proliferação e diferenciação de células precursoras de neutrófilos da medula óssea, bem como potencialização de neutrófilos maduros (YAMAMOTO *et al.*, 2009).

A tecnologia do DNA recombinante possibilitou a clonagem e expressão do gene do hG-CSF em células de mamíferos (células de ovário de hamster chinês – CHO) e em bactérias (*Escherichia coli*), entre outras. Desse modo, foi expresso o fator estimulador da colônia de granulócitos humanos recombinante (rhG-CSF), denominado filgrastima (forma não glicosilada) e lenograstima (glicosilado) (NAGATA *et al.*, 1986).

Estruturalmente, a filgrastima recombinante é constituída por uma cadeia polipeptídica de 175 aminoácidos, com duas pontes dissulfeto e uma metionina N terminal, necessária para expressão em *Escherichia coli*. A massa molecular é de, aproximadamente 18,8 kDa, e ponto isoelétrico (pI) próximo a 6. A lenograstima, produzida em células de mamíferos, possui um carboidrato O-ligado a treonina 133 da biomolécula, que não é essencial para atividade biológica. A pegfilgrastima é a filgrastima conjugada com polietilenoglicol (PEG), que demonstrou maior biodisponibilidade e tempo de ação em estudos de farmacocinética (LU *et al.*, 1989; OH-EDA *et al.*, 1990; LU *et al.*, 1992; FRAMPTON *et al.*, 1994; PIEDMONTE e TREUHEIT, 2008; AHMED *et al.*; 2009).

A clonagem da filgrastima foi realizada na década de 80, sendo aprovada para uso clínico pela Agência Americana *Food and Drug Administration* (FDA) em 1991, e se encontra disponível para uso terapêutico no Brasil sob os nomes comerciais de: Filgrastine[®] (Blausiegel), Filgrastim[®] (Biosintética), Granomax[®] (Dr. Reddys), Granulokine[®] (Roche), Myograf[®] (Bergamo), Leucin[®] (Bergamo) e Tevafilgras[®] (Teva). É indicada para promover a ativação e recuperação de neutrófilos em neutropenia induzida ou causada pela quimioterapia com mielossuppressores, no transplante e degeneração da medula óssea e em neutropenia associada com a síndrome mielodisplástica ou anemia aplástica (HERMAN *et al.*, 1996; RUBENSTEIN *et al.*, 2000).

A atividade biológica de rhG-CSF tem sido avaliada por ensaios biológicos *in vivo* baseados no uso de animais pré-tratados com fármacos anti-neoplásicos para indução da neutropenia e posterior contagem do número de neutrófilos (SHIMAMURA *et al.*, 1987; MATSUZAKI *et al.*, 1996). Recentemente, foi preconizado procedimento baseado na cultura de linhagem de células GNFS-60, dependente desse fator de crescimento (BOWEN *et al.*, 1999; DEFREES *et al.*, 2006).

Deve-se observar que a presença de formas degradadas ou relacionadas em medicamentos biológicos, pode causar efeitos indesejáveis e apresentar atividade farmacológica reduzida ou nula. Por isso, devem ser submetidos a técnicas de controle da qualidade determinando o conteúdo de cada forma e estabelecendo limites nos produtos farmacêuticos. Nesse sentido, diferentes técnicas analíticas encontram-se disponíveis para avaliação da identidade, pureza e potência. A cromatografia líquida por exclusão molecular (CL-EM) e em fase reversa (CL-FR) viabilizam a separação, identificação e quantificação das substâncias biológicas, e tem sido utilizadas para comparação com o bioensaio. Entretanto, diferentemente dos demais medicamentos, em geral é necessária à combinação de métodos biológicos, físico-químicos e imunológicos para monitorar a instabilidade física e química, e para realizar completa caracterização dos produtos biológicos. Acrescenta-se que após o desenvolvimento do método, a validação deve demonstrar, através de estudos experimentais, que o procedimento atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o propósito pretendido, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (WANG, 1999; ICH, 2005; WANG 2005).

A eletroforese capilar (EC) é uma técnica que pode ser utilizada para análise de proteínas ou polipeptídios, incluindo caracterização, identificação, detecção de isoformas, interações entre biomoléculas e quantificação. Seu uso na análise de biofármacos é justificado principalmente devido ao baixo consumo de reagentes e solventes, eficiente separação e detecção de impurezas, em alguns casos com vantagens em relação à cromatografia líquida (CL), tornando essa técnica adequada para o controle da qualidade (HOLZGRABE *et al.*, 2006; LANDERS, 2008; HEMPE, 2008).

A evolução tecnológica possibilitou o desenvolvimento de novos métodos atingindo-se patamar no qual a avaliação de algumas biomoléculas pode ser realizada através de análises físico-químicas. Nesse contexto, os estudos de correlação têm possibilitado avanços que resultaram no desenvolvimento de alternativas para o controle da qualidade, visando substituir, ou reduzir o número de animais nos experimentos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Desenvolver e validar método por eletroforese capilar para a caracterização e avaliação de filgrastima em produtos biofarmacêuticos, estabelecendo correlação com os métodos analíticos validados, contribuindo para aprimorar a área de controle da qualidade, garantindo a segurança e eficácia terapêutica.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar método por eletroforese capilar de zona para análise do fator estimulador da colônia de granulócitos humanos recombinante (filgrastima) em formulações farmacêuticas;
- Realizar estudos de correlação entre os métodos físico-químicos e o bioensaio por cultura de células, avaliando as vantagens e aplicação na área farmacêutica.
- Estudar métodos alternativos que possam ser usados nas etapas de processo, purificação e produto acabado, contribuindo para aprimorar o controle da qualidade, garantindo a eficácia terapêutica e segurança.

REVISÃO DA LITERATURA

3 REVISÃO DA LITERATURA

Citocinas são proteínas ou peptídeos que possuem uma atividade biológica essencial na resposta imune ou inflamatória. Atuam independentemente ou de forma sinérgica, emitindo sinais de acordo com os estímulos recebidos do organismo. Assim, podem ser usadas como biofármacos para reforçar a resposta contra agentes estranhos no tratamento de algumas doenças (MORAES *et al.*, 2007).

O fator estimulador da colônia de granulócitos humanos recombinante (rhG-CSF) é uma citocina que estimula a proliferação e diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas da linhagem de neutrófilos, promovendo aumento na atividade funcional. Clinicamente o rhG-CSF é indicado para reduzir a neutropenia após transplante de medula óssea e em terapia mielotóxica na síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Do mesmo modo para redução de febre em pacientes com doenças não-mielóides que recebem fármacos mielossupressores, para tratar enfermidades neutropênicas congênitas e idiopáticas, autoenxerto e quimioterapia (LIESCHKE e BURGESS, 1992; HERNÁNDEZ-BERNAL *et al.*, 2005; YAMAMOTO *et al.*, 2009).

A sequência de aminoácidos do G-CSF humano foi originalmente estabelecida e então foi realizada a clonagem de cDNA e expressão em células de *Escherichia coli* e mamíferos, entre outros (NAGATA *et al.*, 1986). Dessa forma, o fator estimulador da colônia de granulócitos humanos (rhG-CSF) encontra-se para uso clínico em três formas: não glicosilado, glicosilado e peguilado.

A forma não glicosilada, conhecida como filgrastima, expressa em *Escherichia coli*, é uma proteína hidrofóbica constituída por uma cadeia polipeptídica com 175 aminoácidos e massa molecular de 18,8 kDa, possui duas pontes dissulfeto, entre Cis^{36,42} e Cis^{64,74}, uma cisteína livre em sua forma reduzida na posição 17, e dois resíduos de triptofano nas posições 58 e 118. A filgrastima produzida pela tecnologia do DNA recombinante apresenta sequência de aminoácidos idêntica ao G-CSF humano, com uma metionina N-terminal adicional, e difere pela ausência de O-glicosilação. Seu ponto isoelétrico (pI) é de aproximadamente 6. A estrutura primária está representada na Figura 1 (LU *et al.*, 1989; LU *et al.*, 1992; FRAMPTON *et al.*, 1994; AHMED *et al.*; 2009).

A forma glicosilada, conhecida como lenograstima, produzida em células do ovário de hamster chinês (CHO), com sequência de aminoácidos idêntica à humana, possui um

carboidrato O-ligado a treonina-133 da molécula, que confere maior estabilidade *in vitro*, mas não demonstra ser essencial para atividade biológica da molécula (OH-EDA *et al.*, 1990; SOMERVILLE *et al.*, 1999). Ribarska e colaboradores, em 2008, estudaram a formação de agregados na biomolécula glicosilada, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência por exclusão molecular (CL-EM) e eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições redutoras e não redutoras, na presença de dodecil sulfato de sódio (PAGE-SDS).

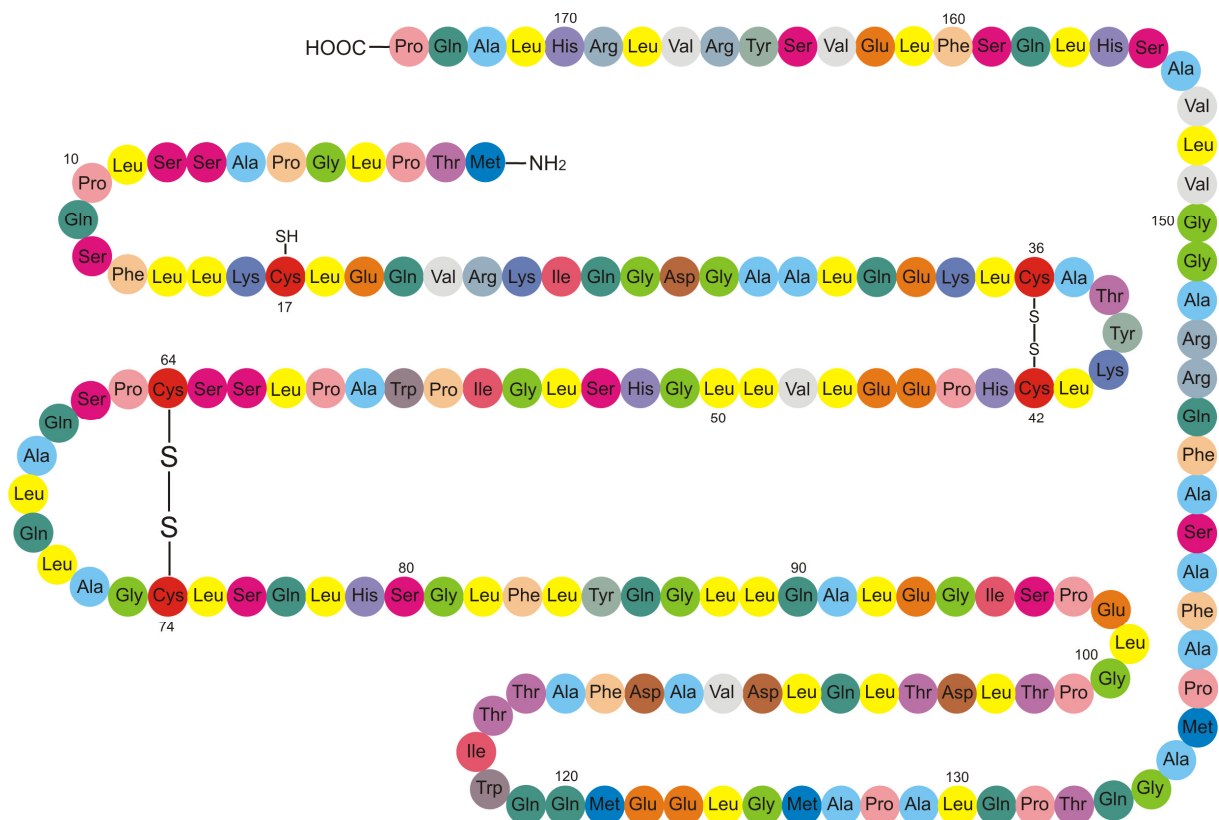


Figura 1 – Estrutura primária da filgrastima (rhG-CSF). Proteína hidrofóbica constituída por uma cadeia polipeptídica com 175 aminoácidos, duas pontes dissulfeto, entre Cys^{36,42} e Cys^{64,74}, e massa molecular de 18,8 kDa.

Ahmed e colaboradores, em 2009, realizaram o sequenciamento da biomolécula de rhG-CSF por eletroforese em gel, digestão em tripsina e quimitripsina, e detecção dos peptídeos por espectrometria de massas, obtendo valor de massa molecular idêntico a estudos anteriores. O método mostrou-se rápido e eficaz, permitindo observar modificações como, oxidação ou desamidação da metionina N-terminal.

Shimamura e colaboradores, que em 1987, realizaram ensaio utilizando modelo animal com neutropenia induzida. Administraram intravenosamente 5-fluoruracil em camundongos fêmeas, com sete semanas de idade, provocando severa neutropenia. Após, injetaram diariamente rhG-CSF, realizando a contagem de neutrófilos aos 5, 7, 11 e 13 dias após administração de 5-fluoruracil.

Matsuzaki e colaboradores, em 1996, analisaram a cinética do número de leucócitos, da concentração de G-CSF no soro e a expressão dos receptores de G-CSF em camundongos após tratamento com fator estimulador da colônia de granulócitos humanos recombinante. Injetaram, intraperitonealmente, ciclofosfamida em camundongos machos, com 8 semanas. Após administraram rhG-CSF. Seis horas após a administração, foram coletados sangue, baço e medula óssea. Observaram aumento significativo no número de neutrófilos do terceiro ao sexto dia.

Para avaliação da atividade *in vitro* foi desenvolvido bioensaio usando a linhagem de células mieloblásticas de camundongos denominadas NFS-60, demonstrando-se sua importância e eficiência para dosagem de rhG-CSF em soro de pessoas sadias e portadoras de doenças hematológicas, e sugerem a aplicação em combinação com ensaio imunoenzimático para análise de mecanismos normais e anormais de produção de neutrófilos (TOHYAMA *et al.*, 1989; SHIRAFUJI *et al.*, 1989). Posteriormente, Hammerling e colaboradores, em 1995, desenvolveram bioensaio para avaliar a atividade do rhG-CSF, com o uso da linhagem de células NFS-60 e detecção colorimétrica em leitor de microplacas.

Bowen e colaboradores, em 1999, realizaram experimentos em camundongos de diferentes linhagens com 6 a 10 semanas de idade, administrando por via subcutânea derivados recombinantes mutantes de G-CSF conjugados com polietilenoglicol. Demonstraram que a neutrofilia está relacionada com a dose e massa molecular do derivado peguilado. Avaliaram também a atividade usando a linhagem GNFS-60 dependente do fator de crescimento, observando que o modelo *in vitro* é inadequado para esses conjugados de alta massa molecular, pois mostra atividade reduzida diferentemente do que ocorre com o ensaio *in vivo*.

Estudo colaborativo internacional, realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC), utilizando bioensaios *in vitro* e imunoensaio, avaliaram diferentes preparações de rhG-CSF em 29 laboratórios de 11 países. Demonstraram que as preparações recombinantes podem apresentar diferente atividade específica. O padrão foi estabelecido com potência de 10.000 UI (MIRE-SLUIS *et al.*, 1995).

Ducongé e colaboradores, em 2005, compararam a farmacocinética de duas formulações comerciais de rhG-CSF após administração subcutânea em coelhos e quantificação por ensaio imunoenzimático (ELISA), demonstrando similaridade entre as formulações.

Hernández-Bernal (2005) avaliaram a equivalência farmacocinética, farmacodinâmica e segurança de duas amostras de rhG-CSF em voluntários humanos. Os níveis de G-CSF no soro foram quantificados por ensaio imunoenzimático. Realizaram contagem de neutrófilos, de leucócitos e células CD34+, como variáveis farmacodinâmicas, até 120 horas. Paralelamente calcularam os parâmetros farmacocinéticos preconizados para cada formulação, concluindo pela sua comparabilidade clínica.

A agregação protéica é o resultado mais comum decorrente de instabilidade da formulação de biofármacos, como filgrastima, podendo ocorrer em todos os estágios de produção (WANG, 2005). Pode ser induzida por fatores físicos e resultar de degradações químicas ou modificações que podem reduzir a atividade e alterar a imunogenicidade (RASO *et al.*, 2005).

Watson e Kenney, em 1988, avaliaram a estabilidade de proteínas através da CL-EM. Misturas complexas de proteínas foram aplicadas à coluna, usando fase móvel de ácido fosfórico 0,1 M, pH 2,5. Foi sugerido que as proteínas poderiam ser determinadas por cromatografia em pH baixo, possibilitando também avaliar a formação de agregados (AUSUBEL *et al.*, 1996; HERMAN *et al.*, 1996).

Chi e colaboradores, em 2003, avaliaram a agregação induzida em soluções nas quais o rhG-CSF era conformacionalmente estável. Por sua vez Krishnan e colaboradores, em 2002, estudaram a agregação do rhG-CSF sob condições fisiológicas, visando estudos de estabilidade. Nesse sentido, Yin e colaboradores (2005), avaliaram as instabilidades químicas e físicas de proteínas terapêuticas, incluindo G-CSF, usando peróxido de hidrogênio para estudar a ação de diferentes excipientes sobre a oxidação das Met¹, Met¹²², Met¹²⁷ e Met¹³⁸. As formas degradadas estudadas, oriundas de processos de redução e oxidação, tiveram suas propriedades biológicas investigadas sendo reconhecidas como importante causa de alteração na eficácia terapêutica.

Lu e colaboradores, em 1999, estudaram o rhG-CSF após modificações oxidativas, analisando os efeitos sobre a estabilidade e atividade biológica, efetuando a análise por exclusão molecular com tampão fosfato pH 7,0. Atividade biológica foi determinada pelo bioensaio da mitogênese de células de medula óssea de camundongos da linhagem BALB/c. Igualmente determinaram as formas oxidadas por CL-FR, observando sua baixa atividade.

Formas alteradas com redução das pontes dissulfeto foram também estudadas por León e colaboradores (1999), usando entre outros, o procedimento por fase reversa.

Niven e colaboradores, em 1994, pesquisaram a estabilidade do rhG-CSF no processo de nebulização. Analisaram os agregados não-covalentes por CL-EM com fase móvel de tampão fosfato de sódio 0,1M em pH 6,9 a 4 °C. Utilizaram também método eletroforético para avaliar alterações químicas decorrentes do processo, detectando banda com maior mobilidade.

Codevilla e colaboradores (2004a,b) avaliaram formulações comerciais de filgrastima disponíveis no País. Realizaram o ensaio biológico baseado no aumento do número de neutrófilos de camundongos machos com 8 semanas de idade, pré-tratados com ciclofosfamida. A contagem microscópica de neutrófilos foi realizada pelo método de coloração de May Grünwald-Giemsa. Desenvolveram e validaram metodologia por CL-EM em coluna TSK G2000 SW, em pH baixo, para análise das preparações de filgrastima.

Raso e colaboradores, em 2005, pesquisaram alterações conformacionais da forma monomérica relacionadas com a agregação do rhG-CSF, explorando mecanismos e condições envolvidas. Realizaram análises espectroscópicas por dicroísmo circular e por CL-EM para a caracterização. Concluíram que a 37 °C pH 7,0, a forma nativa existe em equilíbrio com a conformação alterada, que é altamente propensa à agregação.

Dalmora e colaboradores (2006) desenvolveram e validaram metodologia analítica para avaliação de formulações farmacêuticas de filgrastima por CL-FR. Dímeros, formas de alta massa molecular, sulfóxidos e desamidados foram analisados por CL e correlacionados com bioensaio. Os resultados foram 2,04% menor para CL-FR e 4,03% menor para CL-EM, com correlação ($P > 0,05$). O ensaio por CL-EM combinado com CL-FR foi proposto como alternativa ao bioensaio *in vitro*, para avaliação de potência de filgrastima.

Vanz e colaboradores, em 2008, citam os biossimilares, e descreveram método de baixo custo para produção e purificação de filgrastima em *Escherichia coli*. A molécula foi caracterizada por CL-FR, CL-EM e imunoensaio, e apresentou potência biológica de 109,4% em relação ao padrão. Por sua vez, Kresse (2009), discutiu a produção dos biossimilares, levando em consideração a necessidade de elaborar novas normatizações por parte de órgãos governamentais, que possam assegurar em todos os lotes a qualidade, segurança e eficácia das preparações farmacêuticas.

Pegfilgrastima, a forma peguilada com polietilenoglicol (PEG), confere maior tempo de ação e conseqüente redução do número de injeções nos pacientes, conforme mostram estudos farmacocinéticos realizados em seres humanos (HOLMES *et al.*, 2002;

YAMAMOTO *et al.*, 2009). Piedmonte e Treuheit, em 2008, desenvolveram formulação farmacêutica de filgrastima conjugada com polietilenoglicol (PEG). Avaliaram diferentes métodos de peguilação para obter maior seletividade, e verificaram qual o melhor sítio de ligação para manter a maior atividade biológica. Avaliaram a biomolécula e sua estabilidade na presença de diferentes concentrações de excipientes, utilizando métodos de CL-EM, CL-FR, CL-TI (troca iônica) e PAGE-SDS.

Eletroforese capilar (EC) é uma técnica de separação importante para análises de medicamentos, proteínas, peptídeos, vitaminas, compostos orgânicos e inorgânicos, substâncias quirais, entre outros. A separação decorre do movimento do analito no capilar com o campo elétrico, e também, do fluxo eletro-osmótico (EOF) – fluxo total da solução no interior do capilar devido às superfícies carregadas da parede do capilar, normalmente composta de sílica (MORZUNOVA, 2006; LANDERS, 2008). O movimento do analito carregado através de uma solução condutiva é dependente, sobretudo, da carga e da magnitude do campo elétrico aplicado, assim como, da viscosidade do eletrólito e do raio da molécula. Consequentemente, a mobilidade eletroforética intrínseca do composto é determinada pela combinação de forças de atrito e elétricas, indicando que a separação dos componentes de uma mistura está baseada na relação massa/carga dos analitos (HOLLAND *et al.*, 1997; WÄTZIG e GÜNTER, 2003).

A EC apresenta algumas vantagens sobre a CL, em relação ao custo dos capilares quando comparados à colunas cromatográficas, baixo consumo de solventes e reagentes, e o uso de pequena quantidade de amostra para análise (KOWALSKI *et al.*, 2005; LANDERS, 2008). Porém, a EC pode apresentar desvantagens, como falta de repetibilidade no tempo de migração dos picos, baixa sensibilidade devido ao pequeno volume de amostra injetada, e também a estreita faixa de detecção ocasionada pelo reduzido diâmetro dos capilares de sílica. Entretanto, a adequada seleção dos tampões e condicionamento dos capilares pode otimizar sua execução (HOLZGRABE *et al.*, 2006).

Na EC é possível empregar diversos modos de separação, cada qual com seu mecanismo e seletividade característicos: eletroforese capilar de zona (CZE), eletrocromatografia micelar (MECC), eletroforese capilar em gel (CGE), isotacoforese capilar (CITP), focalização isoelétrica capilar (CIEF) e eletrocromatografia capilar (CEC) (TAVARES, 1997; LANDERS, 2008).

A EC pode ser importante para a identificação, determinação de cargas, isoformas, pureza e quantificação de proteínas na presença de excipientes. Porém, o desenvolvimento do método analítico pode ser mais difícil devido a heterogeneidade, estabilidade e interações

indesejadas das proteínas com as paredes do capilar, que pode originar picos com arraste ou com simetria alterada com baixa resolução e sensibilidade (TSENG *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2001).

A diferenciação das formas glicosiladas e não glicosiladas de rhG-CSF foi obtida através do desenvolvimento de método por EC, utilizando tampão fosfato pH 2,5 e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) em baixa concentração (0,03%), ou tampão fosfato pH 9,0, observando-se melhor resolução e limite de detecção, pela redução das interações indesejadas (SOMERVILLE *et al.*, 1999).

Soluções poliméricas, como o polietilenoglicol, tem sido adotadas para preenchimento de capilares, pois revestimento pode ser facilmente reconstituído após corridas, possibilitando várias análises sem perda de resolução e repetibilidade. (IKI e YEUNG, 1996; TSENG *et al.*, 2000; LIN *et al.*, 2006). Esse procedimento apresentou maior sensibilidade para análise de proteínas (anidrase carbônica, conalbumina, lactoalbumina, inibidor de tripsina, albumina de soro bovino, albumina de soro humano, tripsinogênio e catalase) em amostras de urina, sem necessidade de pré-tratamento (TSENG *et al.*, 2000).

Zhou e colaboradores, em 2004, desenvolveram metodologia por eletroforese capilar de zona capaz de analisar rhG-CSF e distinguir entre suas formas glicosiladas e não glicosiladas, contendo albumina humana, em preparações comerciais. Utilizaram também focalização isoelétrica capilar e espectrometria de massas com ionização por eletrospray para caracterizar as biomoléculas, ressaltando que a associação de métodos é necessária para o controle de qualidade.

O método de eletroforese capilar em gel na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-CGE) é uma alternativa ao método clássico (PAGE-SDS) e, portanto, a substituição está sendo realizada na indústria biofarmacêutica, pois apresenta vantagens como automação do processo, maior velocidade, reprodutibilidade e robustez, permitindo seu uso na rotina do controle de qualidade (RUSTANDI *et al.*, 2008).

O monitoramento da degradação de proteínas terapêuticas demonstra o elevado potencial que a eletroforese capilar possui, tendo em vista seu alto poder de resolução, onde substâncias em solução são separadas basicamente por sua carga e tamanho molecular. Estudos de degradação forçada por altas temperaturas, variações no pH e ciclos de congelamento-descongelamento foram realizados em medicamentos e avaliados por EC (ERIKSSON *et al.*, 2003; NOGUEIRA *et al.*, 2008).

A Farmacopéia Britânica 2010 (BP, 2010), em sua monografia da solução concentrada de rhG-CSF, especifica potência de não menos do que 100 MUI/mg e, além disso, conter o

mínimo de 0,9 mg/mL de rhG-CSF. A potência estimada nos ensaios deve estar entre 80 – 125% e os intervalos de confiança ($P = 0,95$) entre 74 – 136%. A Farmacopéia Americana (USP 33, 2010) não faz referência ao rhG-CSF.

A validação de métodos analíticos é um processo dinâmico e constante que inicia nas fases de seleção, desenvolvimento e otimização da metodologia, qualificação dos instrumentos, materiais e pessoal (RIBANI *et al.*, 2004; SHABIR *et al.*, 2007). Um processo de validação bem definido e documentado fornece evidências objetivas de que o método atende às exigências das aplicações analíticas, sendo adequado para o uso pretendido. Os parâmetros fundamentais avaliados na validação de um método são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, teste de adequabilidade do sistema, limite de detecção e limite de quantificação. A especificidade do método analítico indica sua capacidade de diferenciar e quantificar o analito, na presença de outros constituintes da amostra que inclusive poderiam interferir na sua determinação, como excipientes, impurezas, produtos de degradação ou mesmo outra substância ativa. A linearidade corresponde à capacidade do método analítico para demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração da substância sob análise. A precisão representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de ensaio. É medida através da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade. A repetibilidade é efetuada através de várias análises, nas mesmas condições em curto intervalo de tempo. Essa determinação deve ser feita a partir de, no mínimo, seis determinações na concentração estabelecida correspondente a 100%. A precisão intermediária expressa o efeito das variações devido a eventos como diferentes dias, analistas ou equipamentos. A reprodutibilidade se refere ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios, como parte de estudo colaborativo. A precisão normalmente é expressa através do coeficiente de variação percentual (CV%) ou desvio padrão relativo (DPR). A exatidão descreve a proximidade dos resultados médios fornecidos pelo método em relação ao valor teórico. Pode ser determinada através do ensaio de quantidade conhecida da substância sob análise adicionada em meio preparado com excipientes da formulação. O limite de detecção corresponde à menor concentração da substância em análise que pode ser detectada com certo limite de confiabilidade, porém não necessariamente quantificada com valor exato, utilizando o procedimento experimental. O limite de quantificação representa a menor concentração de um analito que pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. A robustez descreve a reprodutibilidade do método analítico, frente a pequenas variações nas condições experimentais, como por exemplo: proporção e pH da fase móvel,

temperatura, comprimento de onda, estabilidade da solução analítica, entre outros. O teste de adequabilidade do sistema consiste na verificação da resolução e reprodutibilidade do procedimento analítico, e deve ser realizado através da análise de parâmetros como simetria, fator de capacidade, pratos teóricos, resolução, área e tempo de retenção. Desse modo, esses parâmetros demonstram que o método é adequado para a finalidade pretendida, assegurando a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados (SWARTZ e KRULL, 1998; FDA, 2001; ANVISA, 2003; SHABIR, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ERMER e MILLER, 2005; ICH, 2005; ROZET *et al.*, 2007; USP 33, 2010).

Os estudos de métodos físico-químicos alternativos aos bioensaios *in vitro*, são importantes para as análises qualitativas e quantitativas das proteínas relacionadas, e das formas de alta massa molecular das macromoléculas biologicamente ativas. Além disso, a precisão, exatidão, automação e facilidade de execução em relação ao ensaio biológico contribuem para aprimorar o controle da qualidade dos produtos biológicos. Atualmente, os métodos preconizados para as etapas pré-clínicas, avaliação de identidade, pureza, potência e caracterização das biomoléculas são importantes também para fundamentar estudos de biossimilaridade conforme preconizam os guias internacionais, com os avanços sucessivos na área de bioterapêuticos (EMEA, 2005). Porém, avalia-se a disponibilidade de tecnologias analíticas para demonstrar a comparabilidade das biomoléculas, assegurando sua identidade, pureza e teor/potência nos processos de expressão que adotam sistemas celulares diferentes (ROGER e MIKHAIL, 2007).

A publicação científica efetuada no contexto da dissertação está anexada a seguir, observando-se que os materiais e métodos utilizados, bem como os resultados obtidos, encontram-se descritos na mesma.

PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

4 PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA

DALMORA, S. L.; D'AVILA, F. B.; da SILVA, L. M.; BERGAMO, A. C.; ZIMMERMANN, E. S.; Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for assessment of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in pharmaceutical formulations and its correlation with liquid chromatography methods and bioassay. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 2471-2476, 2009.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chromb

Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for assessment of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in pharmaceutical formulations and its correlation with liquid chromatography methods and bioassay

Sergio Luiz Dalmora*, Felipe Bianchini D'Avila, Lucélia Magalhães da Silva, Ana Cláudia Bergamo, Estevan Sonog Zimmermann

Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 January 2009

Accepted 5 June 2009

Available online 13 June 2009

Keywords:

Capillary zone electrophoresis
GNFS-60 cell culture assay
Liquid chromatography
Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor
Validation

ABSTRACT

A capillary zone electrophoresis (CZE) method was validated for the analysis of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) and performed on a fused-silica capillary, with detection at 195 nm. The background electrolyte solution consisted of 50 mM sodium tetraborate solution at pH 9. The method was linear in the concentration range of 1–200 µg/mL and the limit of quantitation (LOQ) was 1 µg/mL, with acceptable validation parameters. The method was applied for the analysis of pharmaceutical formulations, and the results were correlated to the reversed-phase HPLC method (RP-HPLC), size-exclusion HPLC method (SE-HPLC) and *in vitro* bioassay method.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) is one in the family of hematopoietic growth factors which regulates the proliferation and differentiation of cells of neutrophil lineage which is currently available in two forms: non-glycosylated and glycosylated. The non-glycosylated form of the hG-CSF gene has been cloned and the recombinant protein produced in genetically engineered *Escherichia coli*. The hydrophobic protein is a 175 aminoacids chain which contains an extra methionine at its N-terminus. Current clinical uses of rhG-CSF include promoting the recovery of neutrophil count in various conditions such as, neutropenia due to anticancer chemotherapy, neutropenia due to bone marrow transplantation and neutropenia associated with the myelodysplastic syndrome or aplastic anemia [1–4].

The biological activity of rhG-CSF can be evaluated by the *in vivo* assays based on the increase of neutrophil number and leukocyte number of iphosphamide-treated mice [5–7]. The cell culture assays using the growth factor-dependent cell lines NFS-60 or

GNFS-60 were developed to assess the proliferative activity of rhG-CSF and recommended as *in vitro* alternative for the potency evaluation of the biomolecule [8,9].

Many analytical techniques are available to monitor the purity, the chemical stability and the potency of pharmaceutical proteins obtained through recombinant technology, but no single technique can satisfactorily provide sufficient information about a protein. Thus, a combination of physico-chemical, immunological and biological method is recommended for the characterization and to monitor protein instability [3,10]. A size-exclusion HPLC method (SE-HPLC) was previously developed and validated for the analysis of rhG-CSF in pharmaceuticals [11]; it incorporated the ability to detect and separate related substances of higher molecular mass (HMM) and the intact protein. A reversed-phase HPLC method (RP-HPLC) has been reported which separated and quantitated the main peak, as well as the oxidized and denatured related proteins [5]. However, one drawback of this method was that proteins are usually denatured or dissociated as they are adsorbed to the HPLC column matrix. This was found not to be an appropriate analysis technique for establishing the potency of preparations which contain non-covalent oligomers and polymers which may have reduced or no bioactivity [12]. Then, the method was applied for the potency evaluation of rhG-CSF in pharmaceutical formulations in combination with the SE-HPLC and the results were compared to the

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 8952; fax: +55 55 3220 8952.
E-mail address: sdalmora@terra.com.br (S.L. Dalmora).

in vivo bioassay showing significant correlation [5]. The capillary electrophoresis (CE) method was used to analyse rhG-CSF demonstrating differences in migration time and peak shape between the non-glycosylated and glycosylated forms [13]. The rhG-CSF was also characterized by capillary zone electrophoresis (CZE), capillary isoelectric focusing electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry evaluating also the identity and purity of the pharmaceutical preparations [14].

The aim of the present study was to develop and validate a CZE method for the analysis of non-glycosylated rhG-CSF in parallel with the validated RP-HPLC and SE-HPLC methods, and the *in vitro* cell culture bioassay, evaluating the correlations and advantages for the potency assessment of rhG-CSF in pharmaceutical formulations; moreover contribute to the research of alternatives for the quality control assuring the efficacy of this biotherapeutic.

2. Experimental

2.1. Chemical and reagents

The rhG-CSF reference substance was an in-house reference preparation generously supplied by the National Institute for Biological Standard and Control (NIBSC, UK). Leuprorelin acetate (LA), as internal standard (IS), was also supplied by Lab. Quím. Farm. Bergamo (São Paulo, Brazil). A total of seven batches of rhG-CSF from different manufacturers, obtained from commercial sources within their shelf-life period and were identified by Arabic numbers from 1 to 7. Analytical grade di-sodium tetraborate decahydrated was acquired from Merck (Darmstadt, Germany). All chemicals used were of pharmaceutical or special analytical grade. For all of the analyses, ultrapure water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q Gradient A10 system (Millipore, Bedford, Massachusetts, USA). All solutions were degassed by ultrasonication (Tecnal, São Paulo, Brazil) and filtered through a 0.22 µm Millex filter (Millipore).

2.2. Apparatus

CE experiments were performed on an Agilent ^{3D}CE apparatus (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipped with an autosampler, a photodiode array (PDA) detector, a temperature controlling system (4–60 °C) and a power supply able to deliver up to 30 kV. A CE ChemStation software was used for instrument control, data acquisition and analysis. The pH of the solutions was measured by a pH-meter (Thermo Orion, Beverly, Massachusetts, USA).

The LC methods were carried out on a Shimadzu LC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a SCL-10AVP system controller, a LC-10 ADVP pump, a DGU-14A degasser, a SIL-10ADVP autosampler, and a SPD-M10AVP PDA detector. The peak areas were integrated automatically by computer using a Shimadzu Class VP V 6.14 software program.

2.3. Solutions

2.3.1. Preparation of reference and sample solutions

Working standard and sample solutions of rhG-CSF were prepared daily by diluting the reference standard and the sample of pharmaceutical formulation in background electrolyte (BGE) solution, to a final concentration of 50 µg/mL. LA reference solution was also made at a final concentration of 1 mg/mL using water. The stock solution was stored at 2–8 °C protected from light and daily diluted to an appropriate concentration with BGE solution. The sample solution was injected and the amount of the drug calculated against the reference substance.

2.3.2. Preparation of BGE solution

The optimized BGE solution was prepared weighing di-sodium tetraborate decahydrated, equivalent to 50 mM and dissolving in 40 mL of ultrapure water. The pH was adjusted to 9 by adding 1 M sodium hydroxide and the volume completed to 50 mL with ultrapure water. The solution was daily prepared and filtered.

2.4. Electrophoretic procedure

All experiments were carried out on a fused-silica capillary with 75 µm i.d. and 80.5 cm of total length (effective length 72 cm), thermostated at 15 °C, and detection at 195 nm using a PDA detector. At the beginning of each working day, the capillary was conditioned by rinsing with 1 M sodium hydroxide for 20 min, followed by water for 10 min, and then with running electrolyte solution for 20 min. To achieve high migration time reproducibility between injections, the capillary was conditioned with water (3 min), and a running BGE solution (5 min). Samples were injected using the hydrodynamic injection for 6 s at 50 mbar and a constant voltage of 15 kV (current about 51.5 µA) was applied during the analysis. Since electrolisis can change the electroosmotic flow (EOF) and affect the migration time, efficiency and selectivity, after each three injections the running electrolyte solution was replaced by a fresh solution.

2.5. Liquid chromatography procedure

2.5.1. Reversed-phase HPLC method

The validated gradient RP-HPLC method applied for the analysis of rhG-CSF in pharmaceutical formulations is described elsewhere [5]. The elution was carried out on a RP Phenomenex (Torrance, USA) Jupiter C4 column (250 mm × 4.6 mm id, with a particle size of 5 µm and pore size of 300 Å). A security guard holder was used to protect the analytical column. The Shimadzu LC system was operated at controlled-ambient temperature of 25 °C. Mobile phase A consisted of water:acetonitrile (90:10, v/v) containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA), and mobile phase B consisted of water:acetonitrile (20:80, v/v) containing 0.1% (v/v) TFA. The applied gradient was as follows: 0.1 min 66% of B, from 0.1–35 min linear to 85% of B, from 35.1 to 38 min linear back to 66% and 38.1–48 min 66% of B. The elution was performed by a fast gradient at a constant flow rate of 0.5 mL/min, and using PDA detection at 280 nm. The injection volume was 50 µL of the solutions containing 200 µg/mL for both the reference substance and the samples.

2.5.2. Size-exclusion HPLC method

The validated isocratic SE-HPLC method applied is described elsewhere [11]. The elution was carried out on a SE Phenomenex (Torrance, USA) BioSep-SEC-S 2000 column (300 mm × 7.8 mm i.d.). A security guard holder was used to protect the analytical column. The Shimadzu LC system was operated isocratically at controlled temperature 25 °C using a mobile phase of phosphoric acid (0.1 M, pH 2.5) run at a flow rate of 1 mL/min, and using PDA detection at 214 nm. The injection volume was 50 µL of the solutions containing 200 µg/mL for both the reference substance and the samples. At the beginning of each experiment, 50 µL bovine albumin (1 mg/mL) was injected onto the column to reduce non-specific adsorption.

2.6. *In vitro* cell culture bioassay

The proliferative assay was performed as described elsewhere [15]. The GNFS-60 cells were maintained in culture medium RPMI-1640 modified medium supplemented with 5% (v/v) foetal bovine serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 75 cm² flasks and passaged two times a week, seeding at approximately 2–5 × 10⁵ cells/mL. For the assay, the cells were seeded in 96-well

cell culture plates (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) at a density of 10^5 cells/mL (10^4 cells/100 μ L/well) in culture medium and dosed on seeding with 2-fold dilution series range from 1 ng/mL (100 IU/mL) to 1 pg/mL (0.1 IU/mL) of rhG-CSF in culture medium. The negative control was culture medium alone. After incubation (37 °C, 5% CO₂ in air) for 44 h, 10 μ L/well of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide solution at concentration of 5 mg/mL was added and the plates were incubated for further 4 h. The response was measured as the absorbance at 570 nm, using a spectrophotometer (Anthos Labtec Instruments, Wals/Salzburg, Austria).

2.7. Validation of the capillary zone electrophoresis method

The CZE method was validated using samples of pharmaceutical formulation of rhG-CSF with the label claim of 300 μ g/mL by determinations of the following parameters: specificity, linearity, range, precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), robustness, stability, and system suitability test, following the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines [16,17].

2.8. Analysis of rhG-CSF in pharmaceutical formulations

For the quantitation of rhG-CSF in the pharmaceutical formulations, the respective stock solutions were diluted to appropriate concentration with BGE, filtered, injected in triplicate and the percentage recoveries of the drug calculated against the reference substance.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of the electrophoretic conditions

The protein analysis by CE is complicated by the microheterogeneity and reduced stability of proteins and by diverse interactions with the silica surface. The adsorption of proteins causes tailing and broadening of the analyte peak, which leads to loss of resolution and sensitivity [18,19]. To avoid the adsorption problems, chemically bonded capillaries and capillaries dynamically coated with polymers have been used. Poly(ethylene oxide) with relative molecular mass of 8,000,000 g/mol (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) was tested using different conditions, but no improvements of the migration time and peak area ratio (RSD < 1%) related to the optimized method was achieved.

To compensate injection errors and improve the reproducibility of the CZE method, several substances including somatotropin, erythropoietin, feline presin, and leuporelin acetate were tested as

IS for validation procedures of rhG-CSF. Leuporelin acetate, a synthetic nonapeptide analogue of gonadotropin-releasing hormone, was selected as IS due to its suitable peak resolution and migration time.

To obtain the optimum capillary electrophoretic conditions, some electrolyte solutions containing ammonium phosphate, sodium phosphate, sodium acetate, potassium phosphate, tricine, tris (hydroxymethyl) aminomethane, boric acid, di-sodium tetraborate decahydrate, respectively, were investigated in the pH range from 4 to 11, and best results were obtained with the sodium tetraborate solution. The pH of the BGE solution containing 50 mM di-sodium tetraborate decahydrate was evaluated in the range from 9 to 11, and the pH 9 was selected with peak symmetry (about 1.1), since lower pHs resulted in an increase of the migration time and the peak width. The effect of BGE concentration was studied in the range from 25 to 50 mM at pH 9. As the migration time increased with the decrease of the tetraborate solution concentration, the 50 mM tetraborate solution was selected due to the peak symmetry. The effect of the voltage was investigated from 15 to 30 kV, which showed shorter analysis time, better separation efficiencies and acceptable current (about 51.5 μ A) with up to 15 kV potential that was chosen. The capillary temperature was investigated within 15 and 40 °C and the temperature of 15 °C was chosen due to acceptable currents. The sample solutions were hydrodynamically injected at 50 mbar changing the injection time between 3 and 8 s, showing increased peak width and shape deformed after 6 s, thus selected as 6 s. The wavelength detection was evaluated in the range from 190 to 400 nm, and the wavelength of 195 nm was chosen due to the better sensitivity and signal-to-noise ratio.

As demonstrated, the CZE method parameters were optimized to obtain the best peak area, resolution and symmetry, achieved with the 50 mM sodium tetraborate solution at pH 9, with detection at 195 nm. The electropherogram of rhG-CSF pharmaceutical formulation and IS with migration times of 21.8 and 15.8 min, respectively, is shown in Fig. 1.

3.2. Validation of the method

A stability-indicating method is defined as an analytical method that accurately quantifies the active ingredients without interference from degradation products, process impurities, excipients, or other potential impurities [20]. The capability of the method was determined by subjecting a reference substance solution (200 μ g/mL) to accelerated degradation by acidic, basic, neutral and oxidative conditions to evaluate the interference in the quantitation of rhG-CSF. A sample solution prepared in 1 M hydrochloric acid was used for the acidic hydrolysis, and a sample solution in 1 M sodium hydroxide for the basic hydrolysis evaluation. Both solutions were

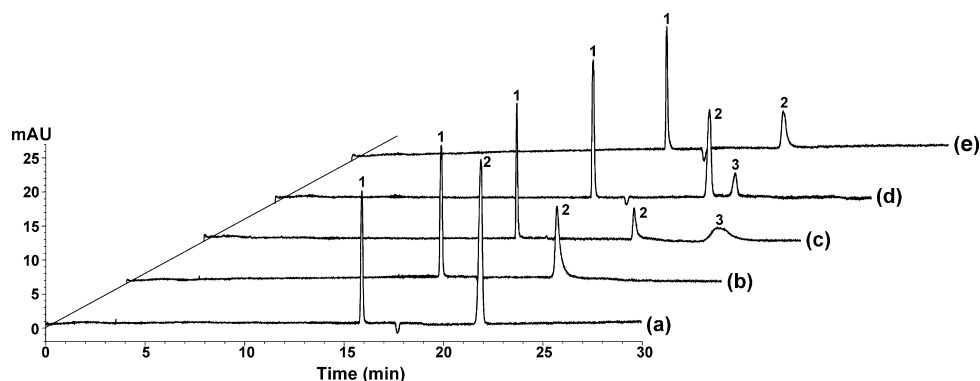


Fig. 1. Representative electropherogram of: (a) rhG-CSF pharmaceutical formulation (50 μ g/mL) and rhG-CSF after degradation under: (b) acidic hydrolysis; (c) basic hydrolysis; (d) neutral heated hydrolysis; (e) oxidative condition. Peak 1: leuporelin acetate (IS); 2 = rhG-CSF; 3 = degraded forms.

Table 1
Inter-day and between-analysts precision data of CZE for rhG-CSF in samples of pharmaceutical formulations.

Sample	Inter-day			Between-analysts		
	Day	Concentration found ^a (%)	RSD ^b (%)	Analysts	Concentration found ^a (%)	RSD ^b (%)
1	1	99.74	1.28	A	100.51	1.61
	2	101.56		B	103.75	
	3	102.25		C	101.66	
2	1	102.49	0.61	A	103.91	0.88
	2	103.49		B	103.89	
	3	103.65		C	102.32	

^a Mean of three replicates.^b RSD = relative standard deviation.

neutralized with acid or base, as necessary. For the study in neutral condition, the reference solution was heated at 55 °C for 10 min and strongly mixing during 3 min. The oxidative degradation was induced by storing the solutions in 3% (v/v) hydrogen peroxide, at ambient temperature for 5 min, protected from light. The solutions were diluted with the electrolyte solution to final concentrations of 50 µg/mL. The interference of the excipients of the pharmaceutical formulation was determined by the injection of a sample containing only placebo (in-house mixture of all excipients). Degradations conditions exhibited a significant decrease of the rhG-CSF area, and two additional peaks were detected under basic hydrolysis and neutral conditions, as shown in Fig. 1. Specificity of the method towards the drug was established through determination of peak purity of the analyte and the IS in the working reference substance solution, obtained by overlay of the spectra captured at the apex, upslope and downslope using a PDA detector. Separation of a spiked sample with glycosylated rhG-CSF was also performed, and additionally, the interference from formulation excipients was assessed giving values of peak purity index in the range of 0.999–1.000, showing that the peaks were free from any coeluting peak, thus confirming that the proposed method is specific for the analysis of rhG-CSF.

Linearity was determined by constructing three calibration curves each one with seven calibration points of rhG-CSF, including the LOQ, in the range of 1–200 µg/mL prepared in BGE solution. Three replicate injections of each reference substance solution spiked with LA 20 µg/mL as IS, were made to verify the repeatability of the detector response. The peak area ratio of rhG-CSF reference substance to the IS, against the respective reference concentrations was used for plotting the graph, and the linearity evaluated by the least square regression analysis. The value of the calculated determination coefficient ($r^2 = 0.9978$, $y = (0.0486 \pm 0.0007)x + (0.0074 \pm 0.0036)$, where x is concentration and y is the peak area ratio of rhG-CSF to IS) indicated the linearity of the calibration curve for the method. Moreover, the relative standard error of slope can be used as a parameter with respect to the precision of the regression, as a general acceptance criterion for the linearity performance of the analytical procedure [21]. This parameter should be comparable to the relative standard deviation obtained in the evaluation of the precision. The result obtained for

Table 2
Accuracy of CZE for rhG-CSF in samples of pharmaceutical formulations.

Nominal concentration (µg/mL)	Mean concentration found ^a (µg/mL)	RSD ^b (%)	Accuracy (%)	Bias ^c (%)
40	40.26	2.33	100.65	0.65
50	49.47	2.17	98.94	-1.06
60	59.66	1.78	99.43	-0.57

^a Mean of three replicates.^b RSD = relative standard deviation.^c Bias = [(measured concentration – nominal concentration)/nominal concentration] × 100.

the relative standard deviation of the slope is 1.44% which is lower than the mean value 1.61%, of the RSD of the precision.

The precision of the method was determined by repeatability and intermediate precision. Repeatability was examined by six evaluations of the same concentration sample of rhG-CSF, on the same day, under the same experimental conditions, calculating the relative standard deviation (RSD) of the migration time and peak area ratio for the concentration of 50 µg/mL. The RSD values obtained were 0.94 and 0.98% for the migration time and peak area ratio, respectively. The intermediate precision was assessed by analyzing two samples of the pharmaceutical formulation on three different days (inter-days) giving mean values of 50.59 and 51.61 µg/mL with RSD 1.28 and 0.61%, respectively. Between analysts precision was determined by calculating the mean values and the RSD for the analysis of two samples of the pharmaceutical formulation by three analysts; the values were found to be 50.99 and 51.69 µg/mL with RSD 1.61 and 0.88%, respectively. The results are shown in Table 1.

The accuracy was evaluated by applying the proposed method to the analysis of an in-house mixture of the excipients with known amounts of drug, to obtain solutions at concentrations of 40, 50, and 60 µg/mL, equivalent to 80, 100, and 120%, of the analytical concentrations, respectively. The accuracy was calculated as the percentage of the drug recovered from the formulation matrix. Three replicate determinations of the three different solutions were carried out, and the absolute means obtained for rhG-CSF are shown in Table 2 with a mean value of 99.67% and bias lower than 1.06%,

Table 3
CZE conditions and range investigated during robustness testing.

Variable	Range investigated	rhG-CSF ^a (%)	RSD ^b (%)	Optimized condition
Electrolyte solution pH	8.8	99.65	1.07	9
	9.0	99.38	0.62	
	9.2	99.35	1.33	
Electrolyte solution concentration (mM)	48	101.66	1.78	50
	50	102.17	0.01	
	52	100.23	0.43	
Temperature (°C)	13	102.14	0.66	15
	15	102.14	0.48	
	17	101.71	0.57	
Voltage (kV)	13	99.03	1.33	15
	15	99.89	0.62	
	17	98.50	1.04	
Time injection (s)	5	99.75	0.13	6
	6	99.78	0.03	
	7	98.52	1.79	
Wavelength (nm)	193	99.17	1.91	195
	195	98.65	1.03	
	197	98.74	1.00	

^a Mean of three replicates.^b RSD = relative standard deviation.

Table 4

Comparative content/potency evaluation of rhG-CSF in pharmaceutical formulations by electrophoretic, chromatographic methods and bioassay against the reference substance.

Sample	CZE ^a (%)	SE-HPLC ^a		RP-HPLC ^a		In vitro bioassay	
		Monomer (%)	HMM ^b (%)	Main peak (%)	Deamidate/sulfoxides (%)	Potency (%)	Confidence intervals (P=0.95)
1	100.23	100.02	0.12	100.05	2.11	103.54	98.71–108.44
2	89.25	86.37	0.31	90.58	1.00	91.72	86.43–97.30
3	76.76	77.91	0.61	80.33	1.45	82.41	78.35–86.67
4	91.84	87.74	4.25	89.90	0.71	92.02	88.61–95.59
5	95.68	95.53	0.16	97.79	1.56	100.53	96.90–104.23
6	101.47	100.92	0.09	102.35	0.82	104.91	98.32–112.01
7	103.20	102.15	0.21	104.13	0.35	105.21	100.10–110.62
Mean	94.06	92.95	0.82	95.02	1.14	97.19	–
SD ^c	9.19	9.14	1.52	8.48	0.60	8.67	–

^a Mean of three replicates.

^b HMM = higher molecular mass substances.

^c SD = standard deviation.

demonstrating that the method is accurate within the desired range [22].

The LOQ and the LOD were calculated from the slope and the standard deviation of the intercept of the mean of three calibration curves, determined by a linear regression model, as defined by ICH [16]. The LOQ was also evaluated in an experimental assay. The obtained values to LOD and LOQ were 0.22 and 0.75 µg/mL, respectively. The LOQ, evaluated experimentally, with a precision lower than 5% and an accuracy within ±5% [23,24], was found to be 1 µg/mL, more sensitive compared to the LOQ found by SE-HPLC (100 µg/mL), suitable for the quality control analysis.

The robustness of an analytical procedure refers to its ability to remain unaffected by small and deliberate variations in method parameters and provides an indication of its reliability for the routine analysis [25,26]. The robustness was determined by analyzing the same samples of the rhG-CSF reference solution containing 50 µg/mL in triplicate by the one variable at a time approach changing electrolyte composition (±2 mM), electrolyte pH (±0.2), capillary temperature (±2 °C), voltage applied (±2 kV), injected time (±1 s), and detection wavelength (±2 nm). The results and the experimental range of the selected variables evaluated in the robustness assessment are given in Table 3, together with the optimized values. The results were within the acceptable deviation (RSD < 2%). There were non-significant changes of the migration time and peak area ratios, and in the electropherogram pattern compared to the optimized conditions, indicating that the proposed method is robust under the conditions tested.

The stability of rhG-CSF in BGE was assessed after the storage of the samples for 48 h at 2–8 °C, and also placed into the autosampler for 24 h at room temperature, showing non-significant change (<2%) relative to freshly prepared samples as suggested [27].

A system suitability test was carried out to evaluate the resolution and reproducibility of the system for the analysis to be performed, using five replicates injections of a reference substance solution containing 50 µg/mL of rhG-CSF. The system suitability test carried out for the migration time, peak area and peak symmetry showed RSD values of 0.02, 1.64 and 1.54%, respectively. The number of theoretical plates was about 58908, with RSD of 1.94%. The parameters tested were within the acceptable range (RSD < 2.0%), indicating that the method is suitable for the analysis intended.

3.3. Method application

The validated CZE method was applied for the determination of rhG-CSF in pharmaceutical formulations in parallel with the validated SE-HPLC and RP-HPLC methods, and the *in vitro* bioassay giving mean values respectively, 1.19% higher, 1.01% and 3.22% lower, as shown in Table 4. The experimental values of the meth-

ods were compared statistically with the *in vitro* bioassay by the Pearson's correlation coefficient showing significant correlations ($P < 0.05$) between the methods with values higher than 0.981. The SE-HPLC method was able to separate and detect dimers, related substances of higher molecular mass and the intact protein. Furthermore, the RP-HPLC method was also used to separate and quantitate the sulfoxides and deamidated related proteins. But, the capability demonstrated for the proposed method can be useful for the determination of rhG-CSF without prior separation of the excipients of the formulation, with advantages of small sample volumes without consumption of organic solvents, better peak efficiency and potential higher speed analyses, that could be also explored. Moreover it can be applied for development of formulations, characterization of charge isoforms and for purity determinations, replacing slab gel techniques, as isoelectric focusing and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

4. Conclusion

The results of the validation show that the CZE method is sensitive with a LOQ of 1 µg/mL accurate with a mean value of 99.67%, economic, specific and stability-indicating. It possesses significant linearity ($r^2 = 0.9978$) and precision of the peak area ratio with a R.S.D. of 0.98% without any interference from the excipients. Therefore, the method was successfully used for the quantitative analysis of rhG-CSF in pharmaceutical formulations as a feasible alternative that can be applied to the purification process and for the quality control, contributing to assure the therapeutic efficacy of the biological medicine.

Acknowledgements

The authors wish to thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), project 305148/2005-2 for the financial support, and to Dr. James N. Ihle from St. Jude Research Hospital for the GNFS-60 cell line for the bioassay.

References

- [1] K.M. Zsebo, A.M. Cohen, D.C. Murdock, T.C. Boone, H. Inoue, V.R. Chazin, D. Hines, L.M. Souza, Immunobiology 172 (1986) 175.
- [2] H.S. Lu, C.L. Clogston, L.O. Narhi, L.A. Merewether, W.R. Pearl, T.C. Boone, J. Biol. Chem. 267 (1992) 8770.
- [3] A.C. Herman, T.C. Boone, H.S. Lu, Characterization, formulation, and stability of Neupogen® (Filgrastim), a recombinant human granulocyte-colony stimulating factor, in: R. Pearlman, Y.J. Wang (Eds.), Formulation, Characterization, and Stability of Protein Drugs, Plenum Press, New York, 1996, p. 303.
- [4] E.B. Rubenstein, Int. J. Antimicrob. Agents 16 (2000) 117.

- [5] S.L. Dalmora, S.M.K. Masiero, P.R. Oliveira, M.S. Sangoi, L. Brum Junior, J. Liq. Chrom. Relat. Technol. 29 (2006) 1753.
- [6] G. Matsuzaki, X.Y. Li, Y. Ohyama, K. Nomoto, Int. J. Immunopharmacol. 18 (1996) 363.
- [7] M. Shimamura, Y. Kobayashi, A. Yuo, A. Urabe, T. Okabe, Y. Komatsu, S. Itoh, F. Takaku, Blood 69 (1987) 353.
- [8] U. Hammerling, R. Kroon, L. Sjödin, J. Pharm. Biomed. Anal. 13 (1995) 9.
- [9] Y. Oshima, A. Tojo, Y. Niho, S. Asano, Biochem. Biophys. Res. Commun. 267 (2000) 924.
- [10] W. Wang, Int. J. Pharm. 185 (1999) 129.
- [11] C.F. Codevilla, L. Brum Junior, P.R. Oliveira, C. Dolman, B. Rafferty, S.L. Dalmora, J. Liq. Chrom. Relat. Technol. 27 (2004) 2681.
- [12] M.T.C.P. Ribela, P.W. Gout, J.E. Oliveira, P. Bartolini, Curr. Pharm. Anal. 2 (2006) 103.
- [13] L.E. Somerville, A.J. Douglas, A.E. Irvine, J. Chromatogr. B 732 (1999) 81.
- [14] G.-H. Zhou, G.-A. Luo, G.-Q. Sun, Y.-C. Cao, X.-D. Zhang, X. Zhang, J. Pharm. Biomed. Anal. 35 (2004) 425.
- [15] S. DeFrees, Z.-G. Wang, R. Xing, A.E. Scott, J. Wang, D. Zopf, D.L. Gouty, E.R. Sjöberg, K. Panneerselvam, E.C.M. Brinkman-Van der Linden, R.J. Bayer, M.A. Tarp, H. Clausen, Glycobiology 16 (2006) 833.
- [16] International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), Geneva, Switzerland, 2005.
- [17] International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceutical for Human Use, Stability Testing of New Drugs Substance and Products Q1A(R2), Geneva, Switzerland, 2003.
- [18] W.-L. Tseng, H.-T. Chang, Anal. Chem. 72 (2000) 4805.
- [19] N. Iki, E.S. Yeung, J. Chromatogr. A 731 (1996) 273.
- [20] K.M. Alsante, A. Ando, R. Brown, J. Ensing, T.D. Hatajik, W. Kong, Y. Tsuda, Adv. Drug Deliv. Rev. 59 (2007) 29.
- [21] J. Ermer, H.J. Ploss, J. Pharm. Biomed. Anal. 37 (2005) 859.
- [22] E. Rozet, A. Ceccato, C. Hubert, E. Ziemons, R. Oprean, S. Rudaz, B. Boulanger, P. Hubert, J. Chromatogr. A 1158 (2007) 111.
- [23] G.A. Shabir, W.J. Lough, S.A. Arain, T.K. Bradshaw, J. Liq. Chrom. Relat. Technol. 30 (2007) 311.
- [24] J. Ermer, J.H.M. Miller (Eds.), Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2005, p. 101.
- [25] R. Injac, M. Boskovic, N. Kocevar, T. Vovk, Anal. Chim. Acta 620 (2008) 150.
- [26] B. Dejaegher, Y.V. Heyden, J. Chromatogr. A 1158 (2007) 138.
- [27] G.A. Shabir, J. Chromatogr. A 987 (2003) 57.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A produção de biomoléculas para uso terapêutico tem avançado significativamente nos últimos anos, devido ao aumento da necessidade por parte da população e avanço das pesquisas na área da biotecnologia. Nesse contexto, o desenvolvimento de métodos para a avaliação da identidade, pureza e potência, fundamenta-se na combinação de técnicas biológicas, físico-químicas e imunológicas, necessárias para a completa caracterização desses biofármacos.

A atividade biológica da filgrastima tem sido determinada por bioensaios *in vivo* e *in vitro* e por cromatografia líquida de alta eficiência. Paralelamente, são realizados procedimentos por eletroforese em gel, focalização isoelétrica e imunoenaios com anticorpos específicos (SHIMAMURA *et al.*, 1987; TOHYAMA *et al.*, 1989; SHIRAFUJI *et al.*, 1989; BOWEN *et al.*, 1999; LU *et al.*, 1999; DALMORA *et al.*, 2006).

Dentre os métodos estudados, a CL é a técnica analítica mais utilizada para análises farmacêuticas, apresentando maior sensibilidade e reprodutibilidade dos resultados. Por sua vez, a EC também vem sendo reconhecida como técnica analítica confiável e reprodutível que permite a otimização de diversos modos de separação utilizando o mesmo equipamento e até o mesmo capilar, com alteração apenas da solução eletrolítica. Atualmente, encontra-se bem estabelecida como técnica que apresenta características como alta eficiência de separação, baixo consumo de amostras e reagentes, tempo de análise reduzido e alto grau de automação (KOWALSKI, 2005; McEVOY *et al.*, 2008). Assim, justifica-se o estudo de métodos por EC, que têm sido usados para diferentes produtos biológicos recombinantes como importante técnica de análise qualitativa e quantitativa, possibilitando estudo de correlação com os métodos de cromatografia líquida e bioensaios. Além disso, é adequado para aplicação durante o processo de produção, para monitorar pequenas variações estruturais e conformacionais que podem causar efeitos significativos sobre a atividade biológica (KAISER *et al.*, 1997).

Desse modo, optou-se por desenvolver e validar procedimento por eletroforese capilar de zona (CZE) para a determinação de filgrastima em formulações farmacêuticas, conforme demonstrado na **PUBLICAÇÃO CIENTÍFICA**, onde também é realizada a comparação com métodos por cromatografia líquida e bioensaio *in vitro*, fundamentando a discussão apresentada abaixo.

O desenvolvimento de método eletroforético para análise de biomoléculas apresenta dificuldades, devido à instabilidade das proteínas e sua interação com as paredes de sílica do capilar. Dessa forma, realizaram-se testes com polímero na solução eletrolítica para reduzir as interações indesejadas, porém sem observar vantagens nos eletroferogramas. Utilizou-se padrão interno (PI) para compensar possíveis erros do sistema de injeção de amostras e melhorar a repetibilidade do método. Assim, diversas substâncias foram testadas, como somatropina, eritropoietina, felipressina, e finalmente a leuprorrelina, que foi escolhida pela simetria do pico, tempo de migração e resolução apresentada.

Para obter resolução adequada na análise, foram testadas diversas soluções eletrolíticas, na faixa de pH entre 4,0 a 11,0, e as melhores condições foram alcançadas utilizando tampão tetraborato de sódio 50 mM pH 9,0. A concentração da solução eletrolítica foi testada entre 25 a 50 mM, mas as menores concentrações apresentaram tempo de migração maior, e a concentração de 50 mM apresentou valor de simetria do pico adequado. Realizaram-se variações na tensão, obtendo melhor resolução corrente adequada (51, 5 μ A) com 15 kV. A temperatura do capilar (15 °C) também foi escolhida com base no melhor tempo de migração e valor da corrente. O tempo de injeção foi testado na faixa de 3 a 8 s, observando o melhor perfil no tempo de 6 s. O comprimento de onda foi pesquisado na faixa de 190 a 400 nm, demonstrando a melhor sensibilidade e sinal-ruído foram a 195 nm.

Portanto, o método de CZE foi otimizado com tetraborato de sódio 50 mM, pH 9,0 e detecção a 195 nm, que apresentou perfil eletroforético adequado, conforme avaliação baseada na área do pico, resolução e simetria. O eletroferograma da formulação farmacêutica de filgrastima e acetato de leuprorrelina (PI), com tempos de migração de 21,8 e 15,8 min, respectivamente, está demonstrado na Figura 1.

A metodologia foi validada através da avaliação dos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e detecção, robustez, estabilidade e adequabilidade do sistema. Na avaliação da especificidade obtiveram-se eletroferogramas nos quais os picos dos produtos de degradação forçada encontram-se resolvidos em relação ao pico da solução padrão e do padrão interno (Figura 1). Além disso, utilizando o detector de arranjo de diodos, verificou-se que a substância química de referência e PI permaneceram com elevada pureza em todas as determinações, demonstrando especificidade e que o procedimento, também pode ser usado para avaliação da estabilidade da formulação. O método apresentou-se linear na faixa de 1 – 200 μ g/mL ($r^2 = 0,9978$), utilizando-se para tanto a relação padrão/padrão interno. Os dados obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária apresentaram coeficientes de variação inferiores a 1,61% (Tabela 1), o que

mostra a precisão do método proposto, destacando-se que a literatura preconiza coeficiente de variação menor ou igual a 2,0%. O valor médio experimental do teste de exatidão foi de 99,67%, conforme Tabela 2, demonstrando exatidão significativa, pois o valor percentual sugerido é de $100 \pm 2\%$ em relação ao declarado (SHABIR, 2003). O limite de quantificação (1 $\mu\text{g/mL}$) mostrou-se adequado para análise de controle de qualidade, e mais sensível quando comparado com o método por CL-EM (100 $\mu\text{g/mL}$). As condições experimentais aplicadas no teste de robustez junto com os parâmetros otimizados não apresentaram alteração significativa nos tempos de migração do padrão e do PI (Tabela 3), confirmando que o método é robusto nas condições analisadas. O teste de adequabilidade do sistema apresentou resultados satisfatórios indicando que o método é adequado para o objetivo proposto. Dessa forma, o método foi aplicado para análise quantitativa de filgrastima e os resultados encontrados foram comparados com aqueles obtidos pelos métodos por CL-EM, CL-FR e bioensaio *in vitro*, apresentando valor médio 1,19% maior, 1,01% e 3,22% menor, respectivamente (Tabela 4). Os valores experimentais dos métodos foram comparados estatisticamente pela ANOVA observando-se que não há diferenças significativas dos resultados ($P > 0,05$). Além disso, determinou-se o coeficiente de correlação de Pearson obtendo-se valores superiores a 0,981.

Demonstrou-se, portanto, que os métodos adotados cumprem os requisitos preconizados pela literatura oficial, podendo ser empregados para análise de filgrastima em produtos farmacêuticos.

A substância concentrada de rhG-CSF está descrita na literatura oficial (BP., 2010), porém nenhuma referência é feita para o produto acabado. Existem métodos cromatográficos publicados, que podem ser utilizados em conjunto com EC para completa caracterização de filgrastima, nas etapas da produção e no controle de qualidade de produtos biológicos recombinantes. Desse modo, contribui-se para aprimorar o controle da qualidade através de uma melhor caracterização da biomolécula, ampliando os procedimentos disponíveis para os estudos de comparabilidade no contexto de biossimilares, garantindo sua eficácia terapêutica e segurança.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- ✓ Desenvolveu-se e validou-se método específico, preciso, exato, sensível e robusto por eletroforese capilar de zona, que forneceu resultados de acordo com os parâmetros preconizados, para identificação e avaliação de filgrastima em produtos farmacêuticos.
- ✓ Sugere-se a aplicação de método por eletroforese capilar para avaliação de pureza e potência de filgrastima, representando alternativa para análise do produto biofarmacêutico, com vantagens de precisão, exatidão, especificidade e tempo de execução em relação ao ensaio biológico *in vitro*, bem como economia de solventes e reagentes, em comparação com a cromatografia líquida.
- ✓ Realizou-se a análise comparativa dos resultados fornecidos pelos métodos por eletroforese capilar de zona, cromatografia líquida em fase reversa, cromatografia líquida por exclusão molecular e bioensaio *in vitro* pela ANOVA, demonstrando que não há diferença significativa ($P > 0,05$). Além disso, avaliaram-se os dados pelo coeficiente de correlação de Pearson obtendo-se valor superior a 0,981.
- ✓ Os métodos pesquisados no presente trabalho contribuem para aprimorar o controle da qualidade, e para realizar estudos de correlação físico-química e biológica, que fundamentam comparabilidade de biomoléculas da área, garantindo a segurança e eficácia terapêutica dos produtos biotecnológicos disponíveis no País.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, K. E. A. M.; CHEN, W.; JOHN, J. P. P.; KANG, S. U.; LUBEC, G. Complete sequencing of the recombinant granulocyte-colony stimulating factor (filgrastim) and detection of biotinylation by mass spectrometry. **Amino Acids**, v. 38, p. 1043-1049, 2009.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Brasília, Diário Oficial da União, 2003.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R. E.; KINGSTON, R.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**, New York: John Wiley; Sons, 1996. 3 v.

BOWEN, S.; TARE, N.; INOUE, T.; YAMASAKI, M.; OKABE, M.; HORII, I.; ELIASON, J. F. Relationship between molecular mass and duration of activity of polyethylene glycol conjugated granulocyte colony-stimulating factor mutein. **Experimental Hematology**, v. 27, p. 425-432, 1999.

BRITISH Pharmacopoeia, London: The Stationery Office, 2010, v. 1, p. 884-887.

CHEN, A. B.; CANOVA-DAVIS, E.; CHEN, A. B.; NASHABEN, W.; WEHR, T. Capillary electrophoresis in the development of recombinant protein biopharmaceuticals. **Chromatographia**, v. 53, p. S7-S17, 2001.

CHI, E. Y.; KRISHNAN, S.; KENDRICK, B. S.; CHAG, B. S.; CARPENTER, J. F.; RANDOLPH, T. W. Roles of conformational stability and colloidal stability in the aggregation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. **Protein Science**, v. 12, p. 903-913, 2003.

CODEVILLA, C. F.; BARTH T.; BRUM JÚNIOR, L.; FRONZA, M.; DALMORA, S. L. Biological potency evaluation and characterization of rhG-CSF in pharmaceutical products. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, p. 37-41, 2004.

CODEVILLA, C. F.; BRUM JÚNIOR, L.; OLIVEIRA, P. ; DOLMAN, C.; RAFFERTY, B.; DALMORA, S. L. Validation of an SEC-HPLC Method for the Analysis of rhG-CSF in Pharmaceutical Formulations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 27, p. 2681-2690, 2004.

DALMORA, S. L.; MASIERO, S.; OLIVEIRA, P.; SANGOI, M. S.; BRUM JUNIOR, L. Validation of an RP-LC Method and Assessment of rhG-CSF in Pharmaceutical Formulations by Liquid Chromatography and Biological Assay. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 29, p. 1753-1767, 2006.

DEFREES, S.; WANG, Z-G.; XING, R.; SCOTT, A. E.; WANG, J.; ZOPF, D.; GOUTY, D. L.; SJOBERG, E. R.; PANNEERSELVAM, K.; BRINKMAN-VAN DER LINDEN, E. C. M.; BAYER, R. J.; TARP, M. A.; CLAUSEN, H. GlycoPEGylation of recombinant therapeutic proteins produced in *Escherichia coli*. **Glycobiology**, v. 16, p. 833-846, 2006.

DUCONGÉ, J.; RODRÍGUEZ-VERA, L.; VALENZUELA, C.; ÁLVAREZ, D.; RAMÍREZ, O.; LUZ-HERNÁNDEZ, K. R.; RABEZ-LÉGON, E. Y.; CASACÓ, A.; FERNÁNDEZ-SANCHES, E. Pharmacokinetic comparison of two recombinant human granulocyte colony-stimulating factor after subcutaneous administration in rabbits. **European Journal of Biopharmaceutical**, v. 61, p. 142-148, 2005.

EMA – The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. “**Guidance on Similar Biological Medicinal Products Containing Biotechnology-Derived Proteins as Active Substance: Quality Issues**”. London, 30 June 2005.

ERIKSSON, H. J. C.; WIJNGAARD, M.; HINRICHS, W. L. J.; FRIJLINK, H. W.; SOMSEN, G. W.; de JONG G. J. Potential of capillary electrophoresis for the monitoring of the stability of placental alkaline phosphatase. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, p. 351-357, 2003.

ERMER, J.; MILLER, J. H. M. **Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005, p. 101-119.

FDA – Food and Drug Administration, Center of Drug Evaluation and Research, **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**, May 2001.

FRAMPTON, J. E.; LEE, C. R.; FAULDS, D. Filgrastim. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in neutropenia. **Drugs**, v. 48, p. 731-760, 1994.

HAMMERLING, U.; KROON, R.; SJÖDIN, L. In vitro bioassay with enhanced sensitivity for human granulocyte colony-stimulating factor. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 13, p. 9-20, 1995.

HEMPE, J. M. Protein Analysis by Capillary Electrophoresis. In:____. **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques**. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap. 2, p. 75-107.

HERMAN, A. C.; BOONE, T. C.; LU, H. S. Characterization, formulation, and stability of Neupogen® (Filgrastim), a recombinant human granulocyte-colony stimulating factor. In: PEARLMAN, R.; WANG, J. (Eds.) **Formulation, Characterization, and Stability of Protein Drugs**, New York: Plenum Press, 1996. p. 303-326.

HERNÁNDEZ-BERNAL, F; GARCÍA-GARCÍA, I; GONZÁLES-DELGADO, C. A.; VELENZUELA-SILVA, C.; SOTO-HERNÁNDEZ, R.; DUCONGÉ, J.; CERVANTES-LLANO, M.; BLANCO-GARCÉS, E.; RODRÍGUEZ, V.; GARCÍA-VEGA, Y.; BELLO-RIVERO, I.; OLIVERA-RUANO, L.; LÓPEZ-SAURA, P. Bioequivalence of two recombinant granulocyte colony-stimulating factor formulations in healthy male volunteers. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 26, p. 151-159, 2005.

HOLLAND, L. A.; CHETWYN, N. P.; PERKINS, M. D.; LUNTE, S. M. Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 4, p. 372-387, 1997.

HOLMES F. A.; JONES, S. E.; O'SHAUGHNESSY, J.; VUKELJA, S.; GEORGE, T.; SAVIN, M.; RICHARDS, D.; GLASPY, J.; MEZA, L.; COHEN, G.; DHAMI, M.; BUDMAN, D. R.; HACKETT, J.; BRASSARD, M.; YANG, B. B.; LIANG, B. C. Comparable efficacy and safety profiles of once-per-cycle pegfilgrastim and daily injection filgrastim in chemotherapy-induced neutropenia: a multicenter dose-finding study in women with breast cancer. **Annals of Oncology**, v. 13, p. 903-909, 2002.

HOLZGRABE, U.; BRINZ, D.; KOPEC, S.; WEBER, C.; BITAR, Y. Why not using capillary electrophoresis in drug analysis? **Electrophoresis**, v. 27, p. 2283-2292, 2006.

ICH - **International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use**: Validation of analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1), p. 1-13, 2005.

IKI, N.; YEUNG, E. S. Non-bonded poly(ethylene oxide) polymer-coated column for protein separation by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 731, p. 273-282, 1996.

KAISER, R. E.; STREGE, M. A.; LAGU, A. L. Assessment of protein drugs obtained by recombinant DNA technology. **Process Control and Quality**, v. 10, n. 1-2, p. 205-228, 1997.

KOWALSKI, P.; KONIECZNA, L.; CHMIELEWSKA, A.; OLEDZKA, I.; PLENIS, A.; BIENIECKI, M.; LAMPARCZYK, H. Comparative evaluation between capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography for the analysis of florfenicol in plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 5, p. 983-989, 2005.

KRESSE, G-B. Biosimilars – Science, status, and strategic perspective. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p. 479-486, 2009.

KRISHNAN, S.; CHI E. Y.; WEBB, J. N.; CHANG, B. S.; SHAN, D.; GOLDENBERG, M.; MANNING, M. C.; RANDOLPH, T. W.; CARPENTER, J. F. Aggregation of granulocyte colony stimulating factor under physiological conditions: characterization and thermodynamic inhibition. **Biochemistry**, v. 41, p. 6422-6431, 2002.

LANDERS, J. P. Introduction to Capillary Electrophoresis. In:____. **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques**. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap. 1, p. 3-74.

LÉON, J.; REUBSAET, E.; BEIJNEN, J.; BENNEKON, W. P.; BULT, A.; HOEKSTRA, A. J.; HOP, E.; OS, P. J. H. J.; TEEUWSEN, J.; UNDERBERG, W. J. M. Reduction of Cys³⁶ - Cy⁴² and Cys⁶⁴ - Cy⁷⁴ disulfide bonds in recombinant human granulocyte colony stimulating factor. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 19, p. 837-845, 1999.

LIESCHKE, G. J.; BURGESS, A.W. Granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **New England Journal of Medicine**, v. 327, p. 28-35, 1992.

LIN, Y-W.; CHANG, H-T. Analysis of double-stranded DNA by capillary electrophoresis using poly(ethylene oxide) in the presence of hexadecyltrimethylammonium bromide. **Journal of Chromatography A**, v. 1130, p. 206-211, 2006.

LU, H. S.; BOONE, T. C.; SOUZA, L. M.; LAI, P. H. Disulfide and secondary structure of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 268, p. 81-92, 1989.

LU, H. S.; CLOGSTON, C. L.; NARHI, L. O.; MEREWETHER, L. A.; PEARL, W. R.; BOONE, T.C. Folding and oxidation of recombinant human granulocyte colony stimulating factor produced in *E coli* characterization of the disulfide-reduced intermediates and Cys Ala analogs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 8770-8777, 1992.

LU, H. S.; FAUSSET, P. R.; NARHI, L. O.; HORAN, T.; SHINAGAWA, K.; SHINAMOTO, G.; BOONE, T. C. Chemical modification and site-directed mutagenesis of

methionine residues in recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effect on stability and biological activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 362, p. 1-11, 1999.

MATSUZAKI, G.; LI, X.; OHYAMA, Y.; NOMOTO, K. Kinetics of serum granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) concentration and G-CSF receptor expression during G-CSF treatment of cyclophosphamide-treated mice. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 18, p. 363-369, 1996.

McEVOY, E.; MARSH, A.; ALTRIA, K.; DONEGAN, S.; POWER, J. Capillary Electrophoresis for Pharmaceutical Analysis. In: __. **Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques**. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 2008. cap. 4, p. 135-170.

MIRE-SLUIS, A. R.; DAS, R. G.; THORPE, R.; The international standard for granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) – Evaluation in an international collaborative study. **Journal of Immunological Methods**, v. 179, p. 117-126, 1995.

MORAES, A. M; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. **Tecnologia do Cultivo de Células Animais: de Biofármacos a Terapia Gênica**. São Paulo: Roca, 2007.

MORZUNOVA, T. G. Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis (a review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 40, p. 158-170, 2006.

NAGATA, S.; TSUCHIYA, M., ASANO, S.; KAZIRO, Y.; YAMAZAKI, T.; YAMAMOTO, O.; HIRATA, Y.; KUBOTA, N.; OH-EDA, M.; NOMURA, H.; ONO, M. Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). **Nature**, v. 319, p. 415-418, 1986.

NIVEN, R.W.; IP, A. Y.; MITTELMAN, S. D.; FARRAR, C.; ARAKAWA, T.; PRESTRELSKI, S. J. Protein nebulization: I. stability of lactate dehydrogenase and recombinant granulocyte-colony stimulating factor to air-jet nebulization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 109, p.17-26, 1994.

NOGUEIRA, D. R.; SANGOI, M. S.; da SILVA, L. M.; TODESCHINI, V.; DALMORA, S. L. Determination of rupatadine in pharmaceutical formulations by a validated stability-indicating MEKC method. **Journal of Separation Science**, v. 31, p. 3098-3105, 2008.

OH-EDA, M.; HASEGAWA, M.; HATTORI, K.; KUBONIWA, H.; KOJIMA, T.; ORITA, T.; TOMONOU, K.; YAMAZAKI, T.; OCHI, N. O-linked sugar chain of human granulocyte

colony stimulating factor protects it against polymerization and denaturation allowing it to retain its activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 11432-11435, 1990.

PIEDMONTE, D. M.; TREUHEIT, M. J. Formulation of Neulasta[®]. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 50-58, 2008.

RASO, S. W.; ABEL J.; BARNES, J.; MALONEY, K. M.; PIPES, G; TREUHEIT, M. J.; KING, J.; BREMS, D. N. Aggregation of granulocyte-colony stimulating factor in vitro involves a conformationally altered monomeric state. **Protein Science**, v. 14, p. 2246-2257, 2005.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBARSKA, J. T.; JOLEVSKA, S. T.; PANOVSKA, A. P.; DIMITROVSKA, A. Studying the formation of aggregates in recombinant human granulocyte-colony stimulating factor (rHuG-CSF), lenogratin, using size-exclusion chromatography and SDS-PAGE. **Acta Pharmaceutica**, v. 58, p. 199-205, 2008.

ROGER, S. D.; MIKHAIL, A. Biosimilars: Opportunity or cause for concern? **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 10, p. 405-410, 2007.

ROZET, E.; CECCATO, A.; HUBERT, C.; ZIEMONS, E.; OPREAN, R.; RUDAZ, S.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 111-125, 2007.

RUBENSTEIN, E. B. Colony stimulating factor in patients with fever and neutropenia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, p. 117-121, 2000.

RUSTANDI, R. R.; WASHABAUGH, M. W.; WANG, Y. Applications of CE SDS gel in development of biopharmaceutical antibody-based products. **Electrophoresis**, v. 29, p. 3612-3620, 2008.

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, p. 57-66, 2003.

SHABIR, G. A.; LOUGH, W. J.; ARAIN, S. A.; BRADSHAW, T. K. Evaluation and application of best practice in analytical method validation. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 30, p. 311-333, 2007.

SHIMAMURA, M.; KOBAYASHI, Y. ; YOU, A.; URABE, A.; KOMATSU, Y.; ITOH, S.; TAKAKU, F. Effect of human recombinant granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic injury in mice induced by 5-fluorouracil. **Blood**, v. 69, p. 353-355, 1987.

SHIRAFUJI, N.; ASANO, S.; MATSUDA, S.; WATARI, K.; TAKAKU, F.; NAGATA, S. A new bioassay for human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) using murine myeloblastic NFS-60 cells as targets and estimation of its levels in sera from normal healthy persons and patients with infectious and hematological disorders. **Experimental Hematology**, v. 17, p. 116-119, 1989.

SOMERVILLE, L. E.; DOUGLAS, A. J.; IRVINE, A. E. Discrimination of granulocyte colony- stimulating factor isoforms by high-performance capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, 732, p. 81-89, 1999.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v.2, n. 1, p. 12-20, 1998.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, p. 493-511, 1997.

THE UNITED States Pharmacopeia. 33. ed. Rockville: The United states Pharmacopeial Convention, 2010.

TOHYAMA, K.; YOSHIDA, Y.; KUBO, A.; SUDO, T.; MORIYAMA, M.; SATO, H.; UCHINO, H. Detection of granulocyte colony-stimulating factor produced by a newly established human hepatoma cell line using a simple bioassay system. **Cancer Research**, v. 80, p. 335-340, 1989.

TSENG, W-L.; CHANG, H-T. On-line concentration and separation of proteins by capillary electrophoresis using polymer solutions. **Analytical Chemistry**, v.72, p. 4805-4811, 2000.

VANZ, A. L. S.; RENARD, G.; PALMA, M. S.; CHIES, J. M.; DALMORA, S. L.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. **Microbial Cell Factories**, v.7, 2008.

WANG, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 185, p.129 – 188, 1999.

WANG, W. Protein aggregation and its inhibition in biopharmaceutics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p.1-30, 2005.

WATSON, E.; KENNEY, W. C. High-performance size-exclusion chromatography of recombinant derived proteins and aggregated species. **Journal of Chromatography**, v. 436, p. 289-298, 1988.

WÄTZIG, H.; GÜNTER, S. Capillary electrophoresis - A high performance analytical separation technique. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, n. 6, p. 724-738, 2003.

YAMAGUCHI, T.; KOGI, M.; YAMAMOTO, Y.; HAYAKAWA, T. Bioassay of human granulocyte colony-stimulating factor using human promyelocytic HL-60 cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 20, n. 9, p.943-947, 1997.

YAMAMOTO, N.; SEKINE, I.; NAKAGAWA, K.; TAKADA, M.; FUKUOKA, M.; TANIGAWARA, Y.; SAIJO, N.; A pharmacokinetic and dose escalation study of pegfilgrastim (KRN125) in lung cancer patients with chemotherapy-induced neutropenia. **Japanese Journal of Clinical Oncology**. v. 39, n. 7, p. 425-430, 2009.

YIN, J.; CHU, J.; RICCI, M.; BREMS, D.; WANG, D; TROUT, B. Effects of excipients on the hydrogen peroxide-induced oxidation of methionine residues in granulocyte colony-stimulating factor. **Pharmaceutical Research**. v. 22, n. 1, p. 141-147, 2005.

ZHOU, G.; LUO, G.; SUN, G.; CAO, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, X. Characterization of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rHuG-CSF) by capillary zone electrophoresis, capillary isoelectric focusing electrophoresis and electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 425-432, 2004.